

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος
Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
«ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ - ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ»

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΙΚΩΝ
ΕΚΧΥΛΙΣΜΑΤΩΝ ΜΕΝΤΑΣ, ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ ΚΑΙ ΤΣΑΓΙΟΥ
ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΒΑΚΤΗΡΙΩΝ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ΚΑΙ
PSEUDOMONAS AERUGINOSA

ΠΑΝΑΓΟΥΛΗΣ ΧΡΗΣΤΟΣ

ΛΑΡΙΣΑ 2010

Μελέτη της αντιμικροβιακής δράσης φυτικών εκχυλισμάτων μέντας,
φασκόμηλου και τσαγιού έναντι των βακτηρίων *Staphylococcus aureus* και
Pseudomonas aeruginosa.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Κουρέτας Δημήτριος (επιβλέπων): Καθηγητής Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μέλη:

Στάγκος Δημήτριος: Λέκτορας Φυσιολογίας Ζωϊκών Οργανισμών του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Μόσιαλος Δημήτριος: Λέκτορας Βιοτεχνολογίας Μικροβίων του Τμήματος Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας.

Ευχαριστίες

Θερμά ευχαριστώ τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Κουρέτα Δημήτριο, για την ευκαιρία που μου έδωσε, συμπεριλαμβάνοντας με στην επιστημονική του ομάδα, να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα διευρύνοντας τους επιστημονικούς μου ορίζοντες.

Εκφράζω τις ευχαριστίες μου και στα μέλη της επιτροπής, τους Λέκτορες κ. Στάγκο Δημήτριο και κ. Μόσιαλο Δημήτριο, για την εκπαίδευσή μου, τη βοήθειά τους σε τομείς άγνωστους για μένα, για τις υποδείξεις τους στον τρόπο εργασίας, αλλά και την υποστήριξη που μου παρείχαν σε οτιδήποτε χρειαζόμουν.

Επίσης ευχαριστώ, τους συναδέλφους μου και όλη την ομάδα του εργαστηρίου, για την άριστη συνεργασία, που αναπτύχθηκε.

Περίληψη

Σήμερα υπάρχει ένας μεγάλος προβληματισμός όσο αναφορά την εμφάνιση και την εξάπλωση ανθεκτικών, σε πολλά αντιβιοτικά, βακτηρίων στον άνθρωπο.

Τα φυτικά εκχυλίσματα πολλών αρωματικών και άλλων φυτών είναι γνωστά για πολλές βιολογικές τους δραστηριότητες, όπως αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αντιμικροβιακές, αγχολυτικές κατασταλτικές και αντιφλεγμονώδης. Η αντιμικροβιακή δράση των φυτικών εκχυλισμάτων, πλούσια σε πολυφαινόλες, φλαβονοειδή και τανίνες, είναι καλά τεκμηριωμένη στη διεθνή βιβλιογραφία.

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιμικροβιακής και κατ' επέκταση της χημειοπροστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων ενδημικών ελληνικών ποικιλιών φασκόμηλου, μέντας και τσαγιού (του βουνού), έναντι gram θετικών (*Staphylococcus aureus*) και gram αρνητικών (*Pseudomonas aeruginosa*) βακτηρίων. Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρεις in vitro μέθοδοι, δυο ποιοτικές, «α) η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δισκία (*disk diffusion method*), β) η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (*wells diffusion method*)» και μια ποσοτική, «η χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*)» για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης. Και οι τρεις μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα των ουσιών να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων.

Από την μελέτη των 23 εκχυλισμάτων των αρωματικών φυτών προέκυψε ότι 5 από αυτά παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση. Το υδατικό εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia officinalis* έδωσε τη μικρότερη ελάχιστη τιμή ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC 2,5mg/ml), ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Sideritis raeseri ssp.raeseri* (MIC 3mg/ml), και ακολουθούν τα υπόλοιπα τρία υδατικά εκχυλίσματα των φυτών *Salvia Pomifera ssp.calycina* (MIC 4mg/ml), *Mentha pulegium* (MIC 4mg/ml), και *Salvia pomifera ssp.pomifera* (MIC 4mg/ml).

Οι διαφορές που παρατηρούνται οφείλονται στο διαφορετικό συνδυασμό και τρόπο δράσης των πολυφαινολικών που περιέχονται στα εκχυλίσματα.

Abstract

Today is a big concern as regard the occurrence and spread of the resistance to many antibiotics, bacteria in humans.

Herbal extracts of many aromatic and other plants are known for many biological activities such as antibacterial, antioxidant, antidiabetic, antibacterial, anholitic repressive and anti-inflammatory. The antimicrobial activity of plant extracts rich in polyphenols, flavonoids and tannins are well documented in the literature.

The purpose research was the study and evaluation of antimicrobial action and thus, the chemioprotective activity of Greek native extracts varieties of sage, mint and tea (the mountain), against gram positive (*Staphylococcus aureus*) and gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* 1737) bacteria. To estimation the antimicrobial capacities of extracts were used three in vitro methods, two qualitative, a) *the disk diffusion method*, b) *the wells diffusion method* and a quantitative, the use of *microtitre plates* for calculate the minimum inhibitory concentration. All these three methods rely on the ability of substances to inhibit bacterial growth.

The study of 23 extracts of aromatic plants showed that five of them result antimicrobial activity. The aqueous extract of the plant of *Salvia officinalis* has the lower minimum inhibitory concentration value (MIC= 2,5 mg / ml), following by the aqueous extract of the plant of *Sideritis raeseri ssp.raeseri* (MIC= 3mg/ml), and followed by the remaining three aqueous extracts of the plants of *Salvia pomifera ssp.calycina* (MIC 4mg/ml), of the *Mentha pulegium* (MIC= 4mg/ml), and of the *Salvia pomifera ssp.pomifera* (MIC= 4mg/ml).

These differences that have been observed have been owned to the different combination and mode of action of the polyphenolic contained in the extracts.

Περιεχόμενα

Περίληψη	5
Abstract	6
Περιεχόμενα	7
Περιεχόμενα Πινάκων	10
Περιεχόμενα Εικόνων	11
Περιεχόμενα Γραφημάτων	12
1. Εισαγωγή	12
1.1. Τα φυτοχημικά ως αντιμικροβιακοί παράγοντες	12
1.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
1.4. Αντιμικροβιακά συστήματα φυτικής προέλευσης	18
1.4.1. Φαινολικές ουσίες (<i>Phenols</i>)	18
1.4.1.1. Φαινολικά οξέα	19
1.4.1.2. Φλαβονοειδή	19
1.4.1.3. Τερπένια	20
1.5. Η Οικογένεια των <i>Χειλανθών</i> (<i>Labiatae</i> ή <i>Lamiaceae</i>)	21
1.5.1. Φασκόμηλο (<i>Salvia spp.</i>)	24
1.5.2. Μέντα (<i>Mentha spp.</i>)	30
1.5.3. Τσάι του βουνού (<i>Sideritis spp</i>)	35
1.6. Σκοπός του πειράματος	39
2. Υλικά και μέθοδοι	40
2.1. Υλικά μεθόδων	40
2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια	40
2.1.3. Εκχυλίσματα	41
2.1.4. Διαδικασία εκχύλισης	42
2.2. Μέθοδοι	43
2.2.1. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων μέσω της Disk Diffusion Susceptibility Testing (<i>Kirby-Bauer Method</i>)	43
2.2.1.1. Αρχή της μεθόδου	43
2.2.1.2. Πειραματική διαδικασία	43

2.2.2. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (<i>Wells-diffusion method</i>)	45
2.2.2.1. Αρχή της μεθόδου - Πειραματική διαδικασία	45
2.2.3. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων μέσω της Μεθόδου Μικροτιτλοποίησης (<i>microtiter plates</i>) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης MIC (<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>)	47
2.2.3.1. Αρχή της μεθόδου -	47
2.2.3.2 Πειραματική διαδικασία	47
2.2.4 Στατιστική ανάλυση	50
3. Αποτελέσματα	50
3.1. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με δίσκία <i>Disk Diffusion Susceptibility Testing (Kirby-Bauer Method)</i>	50
3.1.1. Εκχυλίσματα φασκόμηλου	50
3.1.2. Εκχυλίσματα μέντας	51
3.1.3. Εκχυλίσματα τσαγιού.	52
3.1.4. Συνολικά αποτελέσματα της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με δίσκία <i>Disk Diffusion Susceptibility Testing (Kirby-Bauer Method)</i>	53
3.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (<i>Well diffusion method</i>)	54
3.2.1. Εκχυλίσματα φασκόμηλου	54
3.2.2. Εκχυλίσματα μέντας	54
3.2.3. Εκχυλίσματα τσαγιού	54
3.2.4 Συνολικά αποτελέσματα της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (<i>Well diffusion method</i>)	56
3.2.5 Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα των δυο ποσοτικών μεθόδων αναστολής της ανάπτυξης του <i>Staphylococcus aureus</i>	57
3.3. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (<i>minimum inhibitory concentration</i>) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (<i>microtiter plates</i>)	58

4. Συζήτηση	59
5. Βιβλιογραφία	63

Περιεχόμενα Πινάκων

<u>Πίνακας 1. Εκχυλίσματα Φασκόμηλου (<i>Salvia spp</i>)</u>	<u>41</u>
<u>Πίνακας 2. Εκχυλίσματα Μέντας (<i>Mentha spp</i>)</u>	<u>41</u>
<u>Πίνακας 3. Εκχυλίσματα τσαγιού (<i>Sideritis spp</i>)</u>	<u>42</u>
<u>Πίνακας 4. Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των εκχυλισμάτων</u>	<u>49</u>
<u>Πίνακας 5. Επίδραση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου στην αναστολή της ανάπτυξης <i>Staphylococcus aureus</i> με την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με δίσκία.</u>	<u>50</u>
<u>Πίνακας 6. Επίδραση των εκχυλισμάτων μέντας στην αναστολή της ανάπτυξης <i>Staphylococcus aureus</i> με την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με δίσκία.</u>	<u>51</u>
<u>Πίνακας 7. Επίδραση των εκχυλισμάτων τσαγιού στην αναστολή της ανάπτυξης του <i>Staphylococcus aureus</i> με την Μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με δίσκία.....</u>	<u>52</u>
<u>Πίνακας 8. Συνολικός πίνακας Επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της ανάπτυξης <i>Staphylococcus Aureus</i> μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με δίσκία.....</u>	<u>53</u>
<u>Πίνακας 9. Επίδραση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου στην αναστολή της ανάπτυξης <i>Staphylococcus aureus</i> μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια</u>	<u>54</u>
<u>Πίνακας 10. Επίδραση των εκχυλισμάτων μέντας στην αναστολή της ανάπτυξης <i>Staphylococcus aureus</i> μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια</u>	<u>55</u>
<u>Πίνακας 11. Επίδραση των εκχυλισμάτων τσαγιού στην αναστολή της ανάπτυξης <i>Staphylococcus aureus</i> μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια</u>	<u>55</u>
<u>Πίνακας 12. Συνολικός πίνακας Επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της ανάπτυξης <i>Staphylococcus aureus</i> μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια</u>	<u>56</u>
<u>Πίνακας 13. Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα των δυο ποσοτικών μεθόδων αναστολής της ανάπτυξης του <i>Staphylococcus aureus</i></u>	<u>57</u>
<u>Πίνακας 14. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC (<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>) έναντι του <i>Staphylococcus aureus</i>.....</u>	<u>58</u>

Περιεχόμενα Εικόνων

Εικόνα 1. α) <i>Salvia officinalis</i> , β) <i>Thymus vulgaris</i> , γ) <i>Mentha piperita</i> , δ) <i>Origanum vulgare</i> , ε) <i>Rosmarinus officinalis</i> , στ) <i>Lavandula angustifolia</i> , ζ) <i>Ocimum basilicum</i> , η) <i>Sideritis raeseri</i>	22
Εικόνα 2. α) <i>Salvia officinalis</i> , β) <i>Salvia fruticosa</i> , γ) <i>Salvia argentea</i> , δ) <i>Salvia pomifera</i> , ε) <i>Salvia sclarea</i>	25
Εικόνα 3. α) <i>Mentha piperita</i> , β) <i>Mentha longifolia</i> , γ) <i>Mentha aquatica</i> , δ) <i>Mentha pulegium</i> , ε) <i>Mentha arvensis</i> , στ) <i>Mentha viridis</i> , ζ) <i>Mentha microphylla</i> , η) <i>Mentha rotundifolia</i>	32
Εικόνα 4. α) <i>Sideritis athoa</i> , β) <i>Sideritis scardica</i> , γ) <i>Sideritis raeseri</i> , δ) <i>Sideritis clandestina</i> , ε) <i>Sideritis euboea</i> , στ) <i>Sideritis syriaca</i>	36
Εικόνα 5. Χαρακτηριστικά αναστολής με την μέθοδο διάχυσης σε πηγαδάκια.....	46
Εικόνα 6. <i>ELx808 Absorbance Microplate Reader</i>	48
Εικόνα 7 Χαρακτηριστικά αναστολής σε <i>microtiter plates</i>	49

1. Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες αντιμικροβιακά φυτικά προϊόντα έχουν αποκτήσει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την επιστημονική κοινότητα εξαιτίας της αντίστασης που έχουν αναπτύξει στα αντιβιοτικά διάφοροι μικροοργανισμοί (Essawi και συν. 2000), και των παρενεργειών που μερικές φορές σχετίζονται με αυτά, όπως υπερευαισθησία, ανοσοκαταστολή και αλλεργικές αντιδράσεις (Jang-Gi Choi και συν. 2009).

Επίσης παρατηρείται μια αυξανόμενη ευαισθητοποίηση και ανησυχία εκ μέρους των καταναλωτών για τους δυνητικούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, των συνθετικών πρόσθετων χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται συχνά ως αντιμικροβιακές ουσίες στην επεξεργασία και την αποθήκευση τροφίμων για την εξάλειψη των παθογόνων οργανισμών (Weiduosi και συν.,2006).

1.1. Τα φυτοχημικά ως αντιμικροβιακοί παράγοντες

Από την αρχαιότητα ακατέργαστα φυτικά εκχυλίσματα αρωματικών φυτών έχουν χρησιμοποιηθεί για διαφορετικούς σκοπούς π.χ. ως πρόσθετα τροφίμων, για την παρασκευή φαρμάκων και προϊόντων αρωματοποίησης (Delamare και συν.,2007). Τα φυτικά εκχυλίσματα και τα αιθέρια έλαια των αρωματικών φυτών θεωρούνται ότι έχουν αντιμικροβιακή δράση καθώς επίσης αντιοξειδωτική και αντιφλεγμονώδη (Cowan,1999).

1.2. *Staphylococcus aureus* (Χρυσίζων Σταφυλόκοκκος)

Γενικά χαρακτηριστικά

Ο χρυσίζων σταφυλόκοκκος είναι ένα σφαιρικό βακτήριο το οποίο όταν παρατηρείται στο μικροσκόπιο εμφανίζεται σε ζεύγη, μικρές αλυσίδες, ή συσσωματώματα με μορφή τσαμπιών σταφυλίου. Οι οργανισμοί αυτοί είναι gram-θετικά βακτήρια. Μερικά στελέχη του *Staphylococcus aureus* παράγουν μια ιδιαίτερα σταθερή στη θέρμανση εντεροτοξίνη πρωτεϊνικής φύσης που προκαλεί τροφική δηλητηρίαση.

Συμπτώματα ασθένειας

Η αρχή των συμπτωμάτων της σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης είναι συνήθως γρήγορη και σε πολλές περιπτώσεις οξεία, ανάλογα με την ευαισθησία του κάθε ατόμου στην τοξίνη, το ποσό μολυσμένων τροφίμων που καταναλώνονται, το ποσό τοξίνης στα τρόφιμα που λαμβάνονται και την γενική υγεία του θύματος. Τα πιο κοινά συμπτώματα είναι ναυτία, εμετός, κοιλιακές κράμπες και κατάπτωση. Μερικά άτομα μπορούν να μην εμφανίσουν όλα τα συμπτώματα που συνδέονται με την ασθένεια. Σε πιο βαριές περιπτώσεις μπορούν να εμφανιστούν πονοκέφαλος, μυϊκοί σπασμοί και παροδικές αλλαγές στην πίεση αίματος και τον σφυγμό. Η ανάρρωση διαρκεί γενικά δύο ημέρες, εντούτοις, δεν είναι ασυνήθιστο η πλήρης ανάρρωση να διαρκέσει τρεις ημέρες και μερικές φορές περισσότερο σε βαριές περιπτώσεις. Μολυσματική δόση μια δόση τοξινών λιγότερη από 1,0 μικρογραμμάρια σε μολυσμένο τρόφιμο θα προκαλέσει συμπτώματα της σταφυλοκοκκικής δηλητηρίασης. Αυτό το επίπεδο τοξινών επιτυγχάνεται όταν οι πληθυσμοί του σταφυλόκοκκου ξεπερνούν τους 100.000 ανά γραμμάρια.

Διάγνωση

Στη διάγνωση της σταφυλοκοκκικής τροφικής δηλητηρίασης, κατάλληλες συνεντεύξεις με τα θύματα και η συγκέντρωση και η ανάλυση των επιδημιολογικών στοιχείων είναι ουσιαστικής σημασίας. Τα ενοχοποιημένα τρόφιμα πρέπει να συλλεχθούν και να εξεταστούν για τους σταφυλόκοκκους. Η παρουσία σχετικά μεγάλων αριθμών εντεροτοξιγενών σταφυλόκοκκων είναι ισχυρό αποδεικτικό ότι τα τρόφιμα περιέχουν την τοξίνη. Σε περιπτώσεις όπου τα τρόφιμα μπορεί να είχαν

επεξεργαστεί ώστε να εξουδετερωθούν οι σταφυλόκοκκοι, όπως στην παστερίωση ή θέρμανση, η άμεση μικροσκοπική παρατήρηση των τροφίμων μπορεί να είναι μια βοήθεια στη διάγνωση. Διάφορες ορολογικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό της εντερικής τοξικογονικότητας του σταφυλόκοκκου ο οποίος απομονώνεται στα τρόφιμα καθώς και μέθοδοι για το διαχωρισμό και την ανίχνευση τοξινών στα τρόφιμα έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη διάγνωση της ασθένειας. Τρόφιμα που συχνά συσχετίζονται με τη σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση περιλαμβάνουν τα κρέατα και προϊόντα κρέατος, πουλερικά και αυγά, σαλάτες με αυγά, τόνο, κοτόπουλο και πατάτες, μακαρόνια, προϊόντα αρτοποιίας όπως γλυκίσματα με γέμιση κρέμας, πίτες με κρέμα, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα. Τρόφιμα που απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή κατά την προετοιμασία και τα οποία αποθηκεύονται σε σχετικά υψηλές θερμοκρασίες μετά την προετοιμασία τους συχνά συσχετίζονται με τις σταφυλοκοκκικές τροφικές δηλητηριάσεις.

Οι σταφυλόκοκκοι υπάρχουν στον αέρα, τη σκόνη, τα λύματα, το νερό, το γάλα και τα τρόφιμα ή στο μηχανολογικό εξοπλισμό των τροφίμων, τις περιβαλλοντικές επιφάνειες, τους ανθρώπους και τα ζώα. Οι άνθρωποι και τα ζώα είναι οι αρχικοί ξενιστές. Οι σταφυλόκοκκοι είναι παρόντες στις ρινικές διόδους, στο λαιμό, τις τρίχες, το δέρμα, στο 50 τοις εκατό ή περισσότερο των υγιών ατόμων. Αυτή η συχνότητα είναι ακόμα υψηλότερη για εκείνους που συνδέονται με ή που έρχονται σε επαφή με τα άρρωστα άτομα και το περιβάλλον νοσοκομείων. Αν και οι χειριστές τροφίμων είναι συνήθως η κύρια πηγή μόλυνσης τροφίμων όταν εμφανίζονται πολλά κρούσματα τροφικής δηλητηρίασης, ο εξοπλισμός και οι περιβαλλοντικές επιφάνειες μπορούν επίσης να είναι πηγές μόλυνσης στην περίπτωση του σταφυλόκοκκου. Η ανθρώπινη δηλητηρίαση προκαλείται με τη λήψη των εντεροτοξινών που παράγονται στα τρόφιμα από μερικά γένη σταφυλόκοκκου, συνήθως επειδή τα τρόφιμα δεν έχουν διατηρηθεί αρκετά ζεστά (60 °C, ή περισσότερο) ή αρκετά κρύα (7.2 °C, ή λιγότερο).

Πρόληψη

Η ολική πρόληψη δεν είναι δυνατή, εντούτοις τα κατάλληλα αποθηκευμένα και θερμικά κατεργασμένα τρόφιμα είναι γενικά ασφαλή. Ο μεγαλύτερος κίνδυνος είναι η παράλληλη μόλυνση, όπου το μαγειρευμένο υλικό έρχεται σε επαφή με τα ακατέργαστα προϊόντα ή τα μολυσμένα υλικά (σανίδες τεμαχισμού). Ο ανάρμοστος χειρισμός και η αποθήκευση τροφίμων προκαλούν την ανάπτυξη του βακτηρίου και

την παραγωγή τοξινών. Το ξαναμαγείρεμα των τροφίμων μπορεί να μην καταστρέψει την τοξίνη.

Επιπλοκές:

Θάνατος από σταφυλοκοκκική τροφική δηλητηρίαση είναι πολύ σπάνια, αν και τέτοιες περιπτώσεις έχουν συμβεί μεταξύ των ηλικιωμένων, τα βρέφη και σοβαρά εξασθενημένα άτομα.

Πληθυσμοί σε κίνδυνο

Πιστεύεται ότι όλοι οι άνθρωποι μπορεί να προσβληθούν από αυτού του είδους τη δηλητηρίαση, όμως η ένταση των συμπτωμάτων ποικίλει. (US Department Of Health and Human Service - FDA- US Food and Drug Administration)

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

Η *Pseudomonas aeruginosa* (ψευδομονάδα) ανήκει στην οικογένεια *Pseudomonadaceae* και περιλαμβάνει πολλά είδη, από τα οποία τα περισσότερα ζουν ελεύθερα στο χώμα, το νερό, τη θάλασσα, κτλ. Ορισμένα είδη προκαλούν νόσο σε φυτά, ζώα αλλά και στον άνθρωπο. Επίσης υπάρχουν είδη ψυχρόφιλων ψευδομονάδων που αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται σε αλλοιωμένα τρόφιμα που διατηρούνται στο ψυγείο. Το συχνότερο είδος ψευδομονάδας που προκαλεί νόσο στον άνθρωπο είναι η *Pseudomonas aeruginosa*.

Η *Pseudomonas aeruginosa* είναι ένα Gram αρνητικό, μη σπορογόνο, μη ελυτροφόρο βακτηρίδιο μήκους 1.5-5 μm και διαμέτρου 0.5-1 μm. Τα κύτταρά της διατάσσονται μεμονωμένα, σε ζεύγη ή σε μικρές αλυσίδες. Είναι κινητό βακτήριο και αυστηρά αερόβιο δηλ. χρησιμοποιεί το O₂ ως τελικό δέκτη ηλεκτρονίων. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να χρησιμοποιήσει τα νιτρικά ως εναλλακτικό δέκτη ηλεκτρονίων και με τον τρόπο αυτό να αναπτύσσεται αναερόβια. Το 90% περίπου των στελεχών φέρουν μια πολική βλεφαρίδα. Καλλιεργείται εύκολα στα κοινά θρεπτικά υλικά με άριστη θερμοκρασία αναπτύξεως στους 37°C. Είναι το μόνο είδος

του γένους που αναπτύσσεται στους 42°C και αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται για το χαρακτηρισμό του είδους.

Η *Pseudomonas. aeruginosa* είναι ευκαιριακό παθογόνο μικρόβιο για τον άνθρωπο και σημαντική αιτία σοβαρών ενδονοσοκομειακών λοιμώξεων (Bailey TA και συν., Rahme LG, 2000), όπως ουρολοιμώξεις, μηνιγγίτιδα, λοιμώξεις από καθετήρες, σηψαιμία, πνευμονία, κ.ά. ειδικά σε ανοσοκατεσταλμένους ασθενείς ή σε ασθενείς με προδιάθεση (Khan MO και συν., Unseld H και συν., 2000) και εξωνοσοκομειακές λοιμώξεις όπως ωτίτιδα, λοιμώξεις τραυμάτων, επιπεφυκίτιδα κ.α. Λοιμώξεις από *Pseudomonas. aeruginosa* παρατηρούνται κυρίως σε ασθενείς που πάσχουν από λευχαιμία ή άλλες νεοπλασίες, σε άτομα που έχουν υποστεί εγκαύματα, σε άτομα που πάσχουν από ινοκυστική νόσο, σε άτομα που έχουν υποστεί μεγάλες χειρουργικές επεμβάσεις και σε ασθενείς που θεραπεύονται με ακτινοβολίες, αντιβιοτικά και ανοσοκατασταλτικά φάρμακα.

Είναι από τα κύρια αίτια λοιμώξεων του αναπνευστικού σε περιπτώσεις ινοκυστικής νόσου λόγω χρόνιου αποικισμού από βλεννώδη στελέχη.

Χαρακτηριστικό της *Pseudomonas aeruginosa* είναι η ανθεκτικότητα της στα περισσότερα από τα συνηθισμένα αντιβιοτικά. Η ιδιότητα αυτή κάνει τις λοιμώξεις από *Pseudomonas aeruginosa* επικίνδυνες ιδιαίτερα για τα άτομα που είναι επιβαρυνόμενα από άλλη νόσο.

Εποικίζει πολύ εύκολα τα ενδοσκοπικά ιατρικά όργανα, τα εξαρτήματά τους και τα πλυντήρια ενδοσκοπίων. Σε υγιείς ανθρώπους μπορούμε να την βρούμε στο φάρυγγα (0-7%), στα πτύελα (2%) και στα κόπρανα (3-24%) ενώ στους νοσοκομειακούς ασθενείς μπορεί να ανευρεθεί σε ακόμη μεγαλύτερα ποσοστά (Grogan JB, 1996).

Επιζεί στο χλωριωμένο νερό, στα απολυμαντικά, σε φάρμακα και αποστειρωμένα διαλύματα όπως το αποσταγμένο νερό, οφθαλμικά διαλύματα κ.α. Πολύ καλύτερα αναπτύσσεται σε υγρό και θερμό περιβάλλον και έτσι το νοσοκομειακό περιβάλλον παρέχει απεριόριστες εστίες ανάπτυξης του μικροοργανισμού.

Η *Pseudomonas aeruginosa* παράγει διάφορες χρωστικές ουσίες όπως πυοκυανίνη, πυορουμπίνη, πυομελανίνη, και φθορεσεΐνη. Περισσότερα από το 50% των στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* παράγουν μια υδατοδιαλυτή χρωστική, την πυοκυανίνη που έχει χρώμα κυανοπράσινο και χαρακτηρίζει τα στελέχη της *P. aeruginosa* χωρίς να χρειάζονται περισσότερες βιοχημικές δοκιμασίες για την ταυποίησή τους.

Οι λοιμώξεις που προκαλεί η *Pseudomonas. aeruginosa* είναι σοβαρές και επικίνδυνες διότι αφενός μεν προκαλεί νόσο σε άτομα ήδη επιβαρυνμένα από άλλα νοσήματα, αφετέρου δε γιατί εμφανίζει ανθεκτικότητα στα περισσότερα αντιβιοτικά. Μετά την εγκατάσταση μικροβιαμίας από *Pseudomonas. aeruginosa* η θνητότητα ανέρχεται στο 70% των περιπτώσεων (Δημητρακόπουλος 1982).

1.4. Αντιμικροβιακά συστήματα φυτικής προέλευσης

Σήμερα υπάρχει ένας μεγάλος προβληματισμός όσο αναφορά την εμφάνιση και την εξάπλωση ανθεκτικών, σε πολλά αντιβιοτικά, βακτηρίων στον άνθρωπο (Donabedian, S και συν., 2003, Walker, R. και συν., 2000). Δεδομένου την ευρεία χρήση των αντιβιοτικών στα νοσοκομεία, στη γεωργία και κτηνοτροφία, έχει αυξηθεί και ο αριθμός των ανθεκτικών βακτηρίων στο περιβάλλον (Goodyear, K. L, 2002, Van den Bogaard και συν., 2000). Προφανώς, τα ανθεκτικά βακτήρια δημιουργούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία, όταν υπάρχουν στο περιβάλλον, λόγω της πιθανότητας μετάδοσης στον άνθρωπο (Bates, J , 1994, Shea, K 2003).

Επίσης έχει αυξηθεί το ενδιαφέρον για τη χρήση μη συνθετικών πρόσθετων χημικών ουσιών ως αντιμικροβιακές ουσίες στην επεξεργασία και την αποθήκευση τροφίμων για την εξάλειψη των παθογόνων οργανισμών.(Weiduosí και συν., 2006) Πολλές ουσίες φυτικής προέλευσης, με αναγνωρισμένη αντιμικροβιακή δράση, ενδεχομένως είναι ικανές να χρησιμοποιηθούν γι' αυτό το σκοπό.

Πρόκειται για τις :

- φαινόλες (φαινολικά οξέα, πολυφαινόλες, ανθοκυάνες, τανίνες), φυτικής ή χημικής προέλευσης,
- τα οργανικά οξέα (οξικό, γαλακτικό, κιτρικό) και
- τα αιθέρια έλαια πολλών φυτών. Τα αιθέρια έλαια και οι φυτικές φαινόλες λαμβάνονται με απόσταξη του υγροποιημένου αέρα και εκχύλιση από διάφορα φυτά αντίστοιχα.

Έρευνες έχουν δείξει ότι ορισμένες φαινολικές ενώσεις, από εκχυλίσματα φυτών, έχουν αντιμικροβιακές ιδιότητες που εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων, που προκαλούν κοινούς τύπους τροφικής δηλητηρίασης, όπως είναι το *Staphylococcus aureus* (Akiyama, H και συν., 2001).

Η αντιμικροβιακή δράση από τις πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή και τις τανίνες είναι καλά τεκμηριωμένη στη διεθνή βιβλιογραφία (Ahmad και συν., 2001, Machado και συν. 2003, Naz και συν., 2007, Shan και συν., 2007).

Η κατανάλωση πότων που περιέχουν τανίνες, κυρίως τσάι, μπορεί να θεραπεύσει ή να λειτουργήσει προληπτικά σε διάφορες ασθένειες (Cowan και συν. 2007).

1.4.1. Φαινολικές ουσίες (Phenols)

Οι φαινόλες ανήκουν στην ομάδα των φυσικών αντιμικροβιακών συστημάτων φυτικής προέλευσης. Ο όρος «φαινολικά συστατικά» χημικώς αποδίδεται στις ουσίες

που αποτελούνται από ένα ή δύο αρωματικούς δακτυλίους με ένα ή περισσότερα υδροξυ-υποκατάστατα (Ho, 1992). Εκτός όμως από τις ουσίες με ένα, δύο, ή τρεις αρωματικούς δακτυλίους (π.χ απλές φαινόλες και φαινολικά οξέα) υπάρχουν πολυφαινολικές δομές, όπως τα φλαβονοειδή και αυτές που ανήκουν σε τρεις μεγάλες κατηγορίες πολυμερών: οι λιγνίνες, οι μελανίνες και οι ταννίνες.

Η παρεμποδιστική δράση των φαινολικών ουσιών έναντι διαφόρων μικροοργανισμών όπως, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* έχει μελετηθεί, αποδεικνύοντας ότι τα θετικά κατά Gram βακτήρια είναι πιο ευαίσθητα από τα αρνητικά, με μοναδικές εξαιρέσεις τα Gram αρνητικά *Pseudomonas. Fluorescens* και *Vibrio parahaemolyticus* (Davidson, 1997).

1.4.1.1. Φαινολικά οξέα

Οι ουσίες της εν λόγω ομάδας είναι κυρίως παράγωγα του παραϋδροξυ-βενζοϊκού οξέος (πρωτοκατεχικό, βανιλλικό, γαλλικό, συρινγικό), του ορθοϋδροξυ-βενζοϊκού (σαλικυλικό) και του υδροξυκιναμμικού οξέος (παρα-κουμαρικό, καφεϊκό, χλωρογενικό, φερουλικά), τα οποία έχουν εντοπιστεί σε διάφορα τρόφιμα. Για παράδειγμα, το τσάι είναι μια σημαντική πηγή γαλλικού οξέος. Τα φύλλα τσαγιού μπορούν να περιέχουν πάνω από 4,5 g/Kg φρέσκου βάρους (Manach και συν., 2004).

1.4.1.2. Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή αποτελούν την πιο συνήθη και ευρέως κατανεμημένη ομάδα φυτικών πολυφαινολών. Όσο αφορά στη χημική δομή τους, τα φλαβονοειδή χαρακτηρίζονται από έναν πυρήνα, ο οποίος αποτελείται από δύο αρωματικούς δακτυλίους (Α και Β), που συνδέονται μεταξύ τους μέσω τριών ατόμων C, τα οποία σχηματίζουν έναν οξυγονωμένο ετεροκυκλικό δακτύλιο (δακτύλιος C). Περισσότερα από 4000 φλαβονοειδή έχουν ταυτοποιηθεί μέχρι σήμερα στα φυτά και η λίστα αυξάνεται σταθερά (Cheynier, 2005).

Η ομάδα των φλαβονοειδών, αποτελείται από 12 τάξεις, που διαφέρουν μεταξύ τους στο βαθμό οξειδωσης του κεντρικού αρωματικού δακτυλίου.

Αυτές είναι:

- οι ανθοκυάνες (250 μέλη),
- οι φλαβόνες (350),
- οι φλαβονόλες (350),

- οι *φλαβανόνες* (150),
- τα *ισοφλαβονοειδή* (150),
- οι *χαλκόνες* (60),
- τα *μπιφλαβονοειδή* (65),
- οι *χρυοόνες* (20),
- οι *κατεχίνες* (20),
- οι *προανθοκυανιδίνες* (50),
- οι *φλαβανο-3,4-διόλες* (20) και
- οι *δινδροχαλκόνες* (20).

1.4.1.3. Τερπένια:

Αποτελούν μια πολύ μεγάλη ομάδα χημικών ενώσεων με μεγάλη ποικιλία ιδιοτήτων, έτσι ώστε είναι αδύνατη η γενίκευση σχετικά με τις θεραπευτικές τους δράσεις. Εντούτοις ορισμένα συνήθη τερπένια είναι το λεμονένιο (ένας αντι-ιικός παράγοντας που απαντάται στο 90% των ελαίων των εσπεριδοειδών) και το πινένιο (ένα αντισηπτικό που βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις στα έλαια του πεύκου). Άλλα τερπένια όπως το χαμαζουλένιο και η φαρνεσόλη (βρίσκονται στις ουσίες του χαμομηλιού) επιδεικνύουν σημαντικές αντιφλεγμονώδεις και βακτηριοκτόνες ιδιότητες.

1.5. Η Οικογένεια των Χειλανθών (Labiatae ή Lamiaceae)

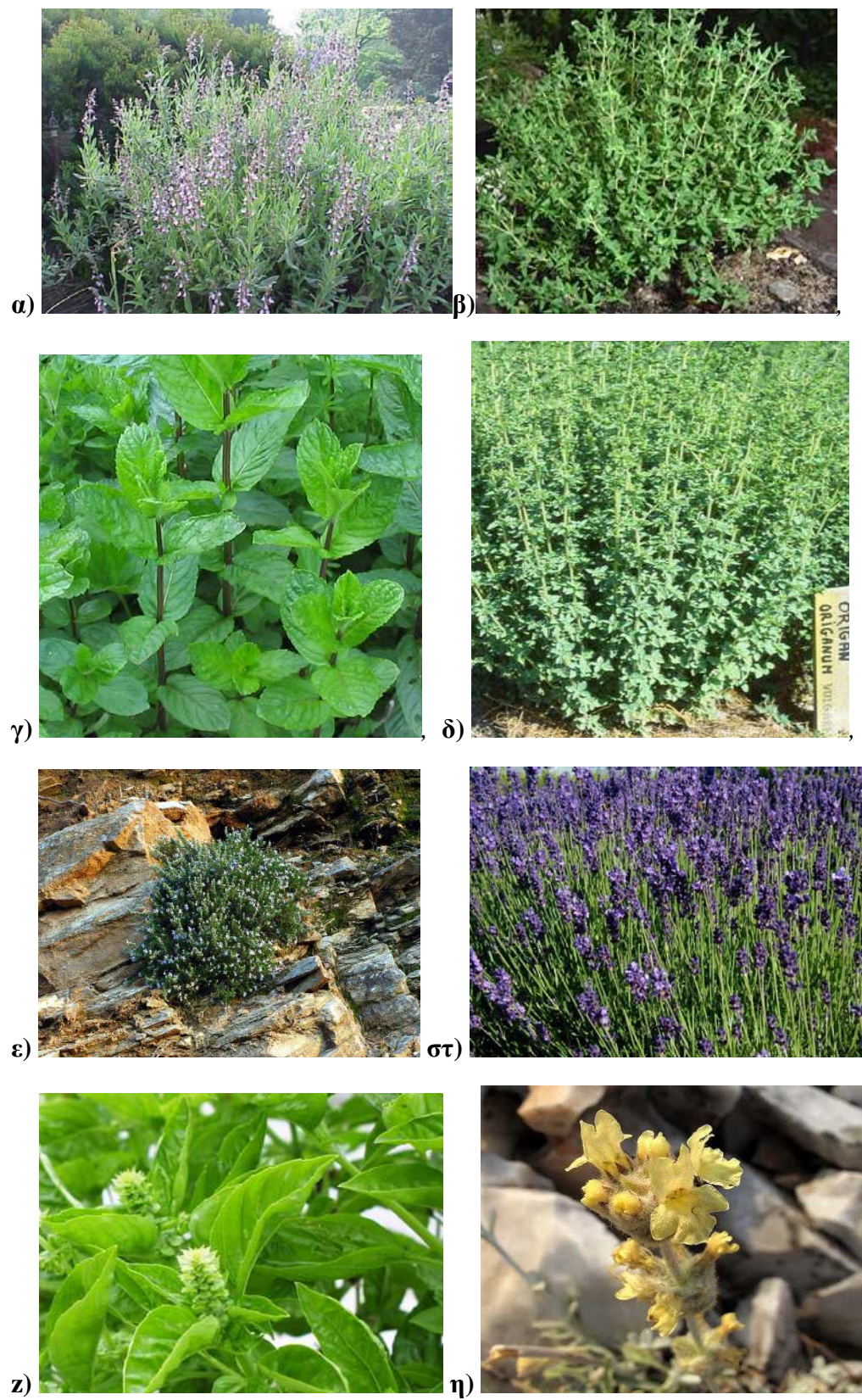
Η οικογένεια των Χειλανθών περιλαμβάνει περισσότερα από 240 γένη και 3500 είδη παγκοσμίως. Η γεωγραφική κατανομή τους είναι κυρίως στη ζώνη της Μεσογείου, αλλά κάποιες ομάδες τις συναντάμε στην Αυστραλία, στη νοτιοδυτική Ασία και νότιο Αμερική (Kokkini 1994). Περιλαμβάνει πολλά γνωστά φυτά, βότανα, θάμνους και δέντρα, περισσότερα από τα οποία είναι αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, όπως το φασκόμηλο (*Salvia*), το θυμάρι (*Thymus*), η μέντα (*Mentha*), η ρίγανη (*Origanum*), το δεντρολίβανο (*Rosmarinus*), η λεβάντα (*Lavandula*), ο βασιλικός (*Ocimum*) και το τσάι του βουνού (*Sideritis*) (Kokkini και συν., 2003, Βαρδαβάκης, 1993) (Εικόνα 1).

Ο όρος «αρωματικά φυτά» αναφέρεται σε μια μεγάλη ομάδα ειδών του φυτικού βασιλείου με κοινό χαρακτηριστικό το ότι περιέχουν στα διάφορα μέρη τους (φύλλα, άνθη, κλπ) αιθέρια έλαια, ουσίες δηλαδή που όταν ελευθερωθούν αφήνουν οσμή (Αναπτυξιακή Εταιρεία Δυτικής Μακεδονίας, ΑΝ.ΚΟ, 2000).

Ο όρος «φαρμακευτικά φυτά» αναφέρεται σε κάθε φυτό που περιέχει ένα ή περισσότερα δραστικά συστατικά, τα οποία έχουν την ικανότητα να προλάβουν, να ανακουφίσουν ή να θεραπεύσουν ασθένειες (Σαρλής, 1994).

Φυτά που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια είναι γνωστά για πολλές βιολογικές τους δραστηριότητες, όπως αντιβακτηριακές, αντιοξειδωτικές, αντιδιαβητικές, αντιμικροβιακές, αγχολυτικές κατασταλτικές και αντιφλεγμονώδης (Ryu και συν., 1997, Delamare και συν., 2006, Loizzo και συν., 2007, Kelen και συν., 2008, Loizzo και συν., 2008), η οποία θα μπορούσε να εξηγήσει εν μέρει τους λόγους για τους οποίους είναι τόσο ευεργετικά στη θεραπεία πολλών ασθενειών.

Τα αιθέρια έλαια εκκρίνονται από τους αδένες των φύλλων και των βλαστών αναγνωρίζονται σε όλο τον κόσμο λόγω των επωφελών χρήσεων για τον άνθρωπο. (Gali-Muhtasib, 2006).



Εικόνα 1. α) *Salvia officinalis*, β) *Thymus vulgaris*, γ) *Mentha piperita*, δ) *Origanum vulgare*, ε) *Rosmarinus officinalis*, στ) *Lavandula angustifolia*, ζ) *Ocimum basilicum*, η) *Sideritis raeseri*

Στη διεθνή βιβλιογραφία βρίσκουμε αρκετές πληροφορίες σχετικά με τις αναλύσεις των αιθέριων ελαίων από τα φυτά, το συνολικό περιεχόμενο σε αιθέρια έλαια, διαφέρει σημαντικά ποιοτικά αλλά και ποσοτικά ακόμα και αν αναφερόμαστε στο ίδιο είδος, ανάλογα με την εποχή, τις περιβαλλοντικές συνθήκες και γενετικές παραλλαγές που επίσης παρατηρούνται ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευσή τους (Ozen και συν., 2004, Amiri, 2007, Formisano και συν., 2007, Raal και συν., 2007, Sefidkon και συν., 2007).

Επίσης το αιθέριο έλαιο κάθε φυτού παρουσιάζει διαφορετική σύνθεση σε κάθε στάδιο αναπτύξεως του και ανάλογα με το χρόνο συγκομιδής του.

Έτσι για παράδειγμα, το φασκόμηλο περιέχει τη διπλάσια ποσότητα σε αιθέρια έλαια τέλος καλοκαιριού σε σχέση με την αρχή της άνοιξης, και με σημαντική διαφορά στα φαινολικά συστατικά (Kokkini και συν., 2003), το ίδιο παρατηρήθηκε στη μέντα πραγματοποιώντας συγκριτικές αναλύσεις, σε δυο στάδια της βλαστικής περιόδου (αρχή και τέλος), με μεγάλες διαφορές στη χημική σύσταση τους (Moleyar V, 1986).

1.5.1. Φασκόμηλο (*Salvia spp.*)

Βοτανικά στοιχεία

Το φασκόμηλο ανήκει στο γένος Αγγειόσπερμων Δικότυλων φυτών που ανήκει στην τάξη Λαμιώδη (Lamiales), της οικογένειας των Λαμίδων ή Χειλανθών (Lamiaceae ή Labiatae) και είναι πολυετείς αειθαλείς θάμνοι. Σε νεαρές ηλικίες είναι γκριζα και χνουδωτά. Έχουν γκριζοπράσινα μαλακά φύλλα, ενώ μωβ-μπλε λουλούδια εμφανίζονται στα άνθη κατά το καλοκαίρι. Το φασκόμηλο προτιμάει ηλιόλουστες περιοχές με αλκαλικά εδάφη. Υπάρχουν περίπου εννιακόσα είδη του γένους *Salvia*, αλλά λίγα είναι ευρέως γνωστά, με σημαντικότερα το *Salvia officinalis*, το *Salvia fruticosa* (syn. *Salvia triloba*), το *Salvia sclarea*, το *Salvia viridis*, το *Salvia horminoides*, *Salvia divinorum*, το *Salvia rutilans* και το *Salvia pomifera*.

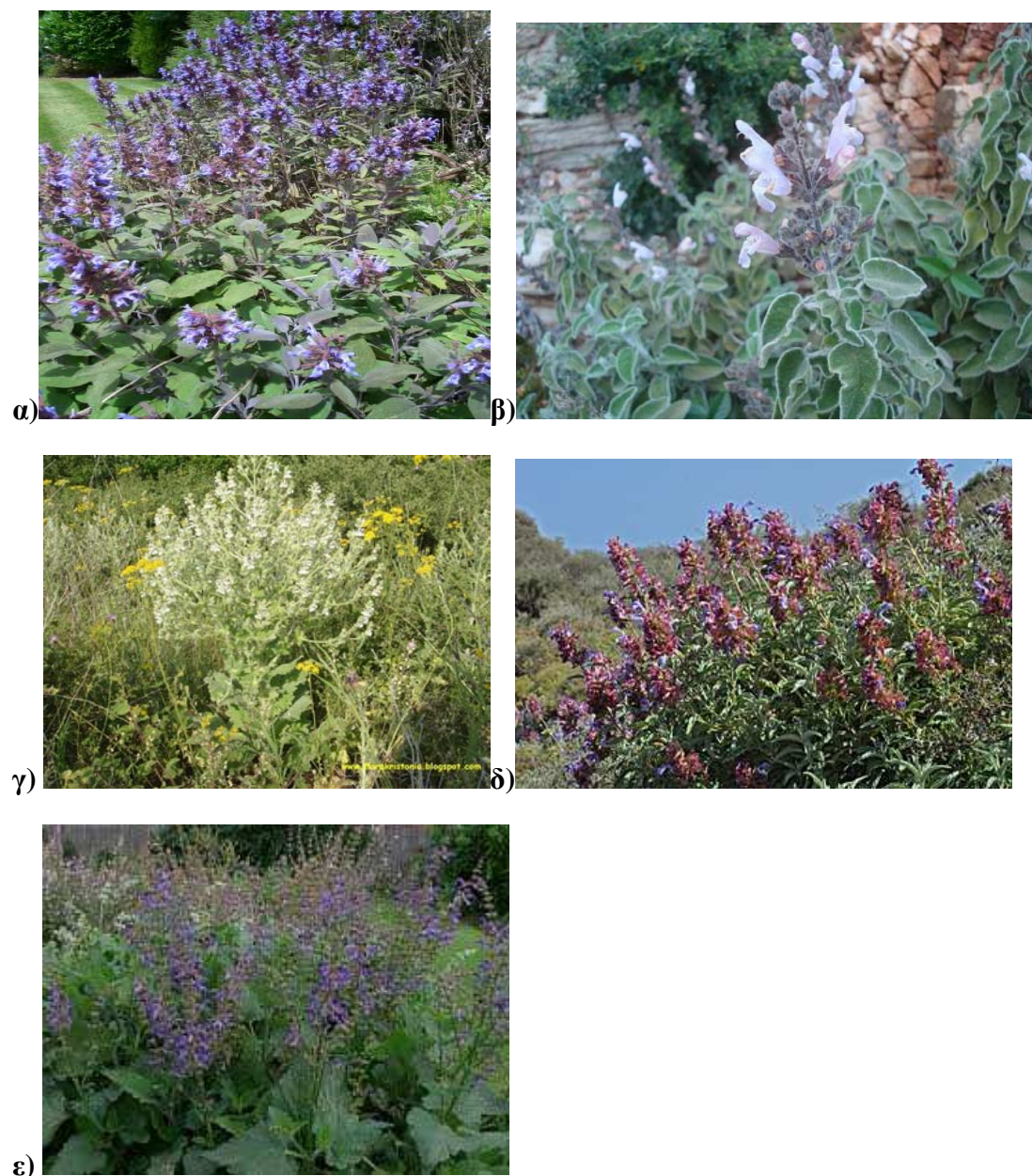
Στην Ελλάδα συναντούμε 23 είδη φασκόμηλου με κοινές ονομασίες όπως αγριοφασκιά, αλιφασκιά, μηλοσφακιά, φασκομηλιά, σπατζιά χαχομηλιά (Davis P., 1982).

Τα σημαντικότερα είδη είναι:

- *Salvia officinalis*, καλλιεργείται στη Γιουγκοσλαβία, στην Αλβανία, στην Τουρκία, στην Ιταλία, στην Ελλάδα, στις Η.Π.Α, στην Ισπανία και στην Κρήτη (Skoula et.al, 2000).

Αξίζει να σημειωθεί ότι στη χώρα μας παρουσιάζει περιορισμένη εξάπλωση ως αυτοφυές (συναντάται μόνο στην περιοχή της Ηπείρου).

- *Salvia fruticosa* (syn. *Salvia triloba*), είναι γνωστό και ως αλιφασκιά (Greek sage) είναι ενδημικό των μεσογειακών και μεσανατολικών χωρών και αποτελεί το κοινότερο είδος του γένους στην Ελλάδα. Φύεται σε περιοχές χαμηλών υψομέτρων (κάτω των 300m), εκτός από την Κρήτη όπου φύεται μέχρι τα 1000 - 1200m.
- *Salvia pomifera* (πικρή φασκομηλιά Cretan sage) είναι ενδημικό της Ν. Ελλάδας και των παραλίων της Μ. Ασίας φυέται σε υψόμετρο μέχρι 500m.
- *Salvia sclarea* (Clary sage), στην Ελλάδα, απαντάται ως αυτοφυές στην Ήπειρο και στη Μακεδονία σε υψόμετρο 300-900m (Simon, J.E 1984, ΛΑΖΑΡΗ Δ, 2005).
- *Salvia argentea* Είναι φυτό που τον πρώτο χρόνο θα αναπτύξει τα εντυπωσιακά μεγάλα αργυρά του φύλλα και το δεύτερο χρόνο τον ανθοφόρο βλαστό (Εικόνα 2).



Εικόνα 2. α) *Salvia officinalis*, β) *Salvia fruticosa*, γ) *Salvia argentea*,
δ) *Salvia pomifera*, ε) *Salvia sclarea*

Βιοδραστικά στοιχεία και βιολογικές ιδιότητες

Τα φυτά του γένους *Salvia* (φασκόμηλο) έχουν χρησιμοποιηθεί για τις ευεργετικές ιδιότητές τους για χιλιετίες. Η λέξη *Salvia* προέρχεται από το λατινικό “*salvare*” που σημαίνει σώζω. Αρχαίοι συγγραφείς αναφέρονται σε είδη *Salvia* και κυρίως στις *S. officinalis*, *Salvia fruticosa* (syn. *Salvia triloba*) και *Salvia pomifera* με το όνομα ελελίφασκον.

Κατά το μεσαίωνα, χρησιμοποιούνταν κατά κόρον για προβλήματα υγείας, λέγεται ότι ο Καρλομάγνος είχε διατάξει να φυτεύεται σε λαχανόκηπους και στους κήπους στα μοναστήρια. Σε επιδημίες, ειδικά αυτές της χολέρας, πίστευαν ότι όποιος έχει στο σπίτι του φυτεμένη φασκομηλιά δε φοβάται το θάνατο (Ζαννέτου-Παντελή 2000).

Διάφορα είδη *Salvia* έχουν χρησιμοποιηθεί στην λαϊκή ιατρική για θεραπεία τη πληγών και την ανακούφιση του στομάχου, του ήπατος, και πόνους ρευματισμών και για την αντιμετώπιση του κοινού κρυολογήματος, με τη μορφή έγχυσης και αφέψημα σε διάφορα μέρη του κόσμου (Bayrak και συν., 1987, Sezik και συν., 1999). Εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια τους χρησιμοποιούνται σε τρόφιμα φαρμακευτικών προϊόντων, καθώς και στην αρωματοποιία.

Τα διάφορα είδη φασκόμηλου περιέχουν κυρίως αιθέριο έλαιο και φαινολικές ενώσεις (Baser και συν., 1998).

Μερικά από τα φαινολικά συστατικά των φυτών που ανήκουν σε αυτό το γένος έχουν δείξει επίσης α) άριστη αντιμικροβιακή δράση, β) αναστολή της υπεροξειδωσής των λιπιδίων, γ) αντιοξειδωτική δράση (Hohmann και συν., 1999, Masaki, και συν., 1995, Pizzale και συν., 2002) και δ) τα εκχυλίσματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη σταθεροποίηση λίπους και τροφίμων που περιέχουν λίπος (Schwarz K, και συν. 1995).

Η αντιμικροβιακή δράση του *Salvia officinalis* είναι γνωστή από δεκαετίες πριν (Jalsenjak, V και συν., 1987) και έχει αποδοθεί στην παρουσία α- και η β- θυγιόνης (Lawrence B 1992) και 1,8 κινεόλης, θυγιόνης και καμφοράς (Jalsenjak, V και συν., 1987, Sur και συν. 1991). Άλλοι δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται στο είδος αυτό είναι το β-πινένιο, διτερπένια, τριτερπένια, φλαβονοειδή, συστατικά φαινολικών οξέων και φαινολικοί γλυκοζίτες (Miura και συν., 2000). Επίσης μελέτες έχουν επισημάνει και την αντιμικροβιακή δράση του *Salvia fruticosa*, του οποίου τα κυριότερα χαρακτηριστικά του αιθέριου ελαίου είναι (η 1,8 κινεόλη, το β-μυρκένιο,

το α και β-πινένιο, η α και β-θυιόνη και η καμφορά (Skoula και συν., 2000, Sivropoulou και συν. 1997).

Οι Sivropoulou και συν. μελέτησαν την αντιμικροβιακή δράση του αιθέριου ελαίου της *Salvia. fruticosa* και καταλήγοντας στο συμπέρασμα ότι και το έλαιο αλλά και οι μεταβολίτες α- και β-θυιόνη, 1,8-κινεόλη είχαν αντιβακτηριακή δράση έναντι οκτώ βακτηριακών ειδών (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Rhizobium leguminosarum* και *Bacillus subtilis*), ενώ η καμφορά βρέθηκε σχεδόν ανενεργή σε όλα τα βακτήρια που εξετάστηκαν

Από τα πρακτικά επιστημονικής διημερίδας με θέμα «Το Ελληνικό Φασκόμηλο» (Κουλάδη Μ, 2005), μπορούμε να δούμε ότι η σύσταση των κυρίως συστατικών του αιθέριου ελαίου του ήταν 1,8-κινεόλη, η καμφορά, η α- και η β-θυιόνη, το trans-καρνοφυλλένιο και το β-πινένιο. Το μεγαλύτερο ποσοστό καταλαμβάνουν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, ενώ ακολουθούν τα μονοτερπένια, τα σεσκιτερπένια, τα οξυγονωμένα σεσκιτερπένια και τα διτερπένια.

Σημαντική αντιβακτηριακή δράση φάνηκε να έχει το κλάσμα των διτερπενικών οξέων εκχυλίσματος *Salvia apiana* έναντι του βακτηρίου *Klebsiella pneumoniae* στη συγκέντρωση των 400 µg/ml και του *Bacillus subtilis* στη συγκέντρωση των 300 µg/ml και του *Staphylococcus aureus* στη συγκέντρωση των 200 µg/ml. (Τζάκου Ο, 2005)

Ανάλυση νωπών φύλλων και ανθέων του *Salvia pomifera*, της ευρύτερης περιοχής της Πελοποννήσου, έδειξε ότι τα κύρια συστατικά των φύλλων είναι α-θυιόνη, β-θυιόνη, και 1,8-κινεόλη, και των ανθέων β-θυιόνη, β-μπιζαμπολένιο και β-καρνοφυλλένιο (Bellomaria και συν., 1992).

Σε πολλές μελέτες το φασκόμηλο φαίνεται, ότι διαθέτει αντιοξειδωτικές ουσίες. Σύμφωνα με μελέτες το φασκόμηλο έδειξε, ότι παρήγαγε φαινολικές ουσίες με αντιοξειδωτική δράση, που οφειλόταν στην παρουσία καρνοσικού και ροσμαρινικού οξέος (Yinrong και συν., 1999). Η αντιοξειδωτική του δράση, αποδόθηκε σε στοιχεία, όπως τερπενοειδή, φλαβονοειδή, και φαινολικά οξέα, όπως επίσης και ενεργά oligομερή καφεϊκού οξέος, όπως σαλβιανολικά οξέα (Yinrong και συν., 2000). Επιπλέον, έχουν εντοπιστεί παράγοντες, όπως τα τριτερπένια ολεανολικό και ουρσολικό οξύ ή το διτερπένιο καρνοσολικό οξύ, τα οποία έχουν αντιφλεγμονώδη δράση (Baricevic και συν., 2001).

ΤΕΡΠΗΝΙΑ

Τριτερπενοειδή

Τα πιο κοινά τριτερπενοειδή, που απαντώνται στα περισσότερα είδη *Salvia* είναι τα ουρσολικό και ολεανολικό οξύ, τα οποία έχουν απομονωθεί από τη *Salvia officinalis*. Τα τελευταία χρόνια έχουν απομονωθεί και άλλα τριτερπενοειδή από διάφορα είδη *Salvia*. Ενδεικτικά αναφέρονται τα: αναγαδιόλη, οξικός εστέρας της ταραξερόλης, γερμανικόλη, οξικός εστέρας του α-αμιραδιενυλίου και νιβαδιόλη από τη *Salvia broussonetti*.

Διτερπενοειδή

Τα είδη *Salvia* περιέχουν διτερπενοειδή τύπου αβιετανίου, κλεροδανίου, πιμαρανίου και λαβδανίου. Τα διάφορα είδη *Salvia*, με εξαίρεση τα αμερικάνικα είδη, περιέχουν κυρίως διτερπένια τύπου αβιετανίου στις ρίζες τους ενώ διτερπένια τύπου κλεροδανίου και λαβδανίου είναι αρκετά σπάνια. Ενώ στα αμερικάνικα είδη διτερπένια τύπου κλεροδανίου που βρίσκονται στα εναέρια τμήματα ή σε ολόκληρο το φυτό.

Διτερπένια τύπου αβιετανίου

Οι τανσινόνες είναι αρκετά γνωστά διτερπένια τύπου αβιετανίου που πρώτο-απομονώθηκαν από τη *Salvia. miltiorrhiza*. Τα πρώτα διτερπένια που ανιχνεύθηκαν από το φυτό αυτό ήταν οι τανσινόνες I, II και III και αργότερα οι ισοτανσινόνες I και II και ισοκρυπτοτανσινόνη και κρυπτοτανσινόνη

Διτερπένια τύπου κλεροδανίου

Τα αμερικάνικα είδη *Salvia* περιέχουν κυρίως διτερπένια τύπου κλεροδανίου στα εναέρια τμήματα ή σε ολόκληρο το φυτό και σπάνια τύπου αβιετανίου. Από μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί σε φυτά από το βοτανικό κήπο του Παλέρμο στην Ιταλία τα οποία είχαν προέλθει από το Μεξικό, βρέθηκαν νέα διτερπένια τύπου κλεροδανίου: σαλβικοκκίνη από τη *Salvia coccinea* και σαλβιφαρίνη και σαλβιφαρικίνη από τη *Salvia farinacea*.

Διτερπένια τύπου λαβδανίου και πιμαρανίου

Αυτού του τύπου τα διτερπένια είναι σχετικά σπάνια στα είδη της *Salvia*. Ενδεικτικά αναφέρονται το οξειδίο της μανούλης που απομονώθηκε από τη *Salvia candidissima* subsp. *occidentalis*.

Σεσκιτερπένια

Τα σεσκιτερπένια είναι σπάνια συστατικά των ειδών *Salvia*. Από τη *Salvia palaefolia*, ένα φυτό από τη Ν. Αμερική απομονώθηκαν δύο σεσκιτερπένια: το οξείδιο του καρυοφυλλενίου και το γλεχομαφουράνιο

Σεστερπένια

Έχουν αναφερθεί σεστερτερπένια από διάφορα είδη *Salvia*, όπως ο μεθυλεστέρας του σαλβιλευκολιδίου από τη *Salvia. hypoleuca*.

Πολυφαινολικές ενώσεις

Το γένος της *Salvia* περιέχει μία πληθώρα πολυφαινολικών, με περισσότερες από 160 ταυτοποιημένες ενώσεις, μερικές από τις οποίες είναι μοναδικές στο γένος. Ένας μεγάλος αριθμός των ουσιών αυτών προέρχονται από το καφεϊκό οξύ μέσω διαφόρων χημικών μετατροπών.

Φλαβονοειδή

Τα φλαβονοειδή είναι ευρέως διαδεδομένα στο γένος *Salvia* και κυρίως οι φλαβόνες, οι φλαβονόλες και οι γλυκοσίδες αυτών. Έχει αναφερθεί ότι η παρουσία 6-υδροξυλιωμένων φλαβονών έχει ιδιαίτερη χημειοταξινομική σημασία για το γένος.

Όσον αφορά το είδος *Salvia. officinalis* ενδεικτικά αναφέρουμε τα εξής φλαβονοειδή:

Φλαβόνες: 5,4'-OH-7-OMe (γενκβανίνη), 5,7,4'-OH-6-OMe (ισπιντουλίνη), 5,4'-OH-6,7-OMe (σιρσιμαριτίνη), 5-OH-6,7,4'-OMe (σαλβιγενίνη) (**30**), 5,7,3',4'-OH (λουτεολίνη), 5,7,4'-OH (απιγενίνη), 5,3',4'-OH-7-OMe, 5,7,3',4'-OH-6-OMe (νεπετίνη), 5,3',4'-OH-6,7-OMe (σιρσιλιόλη), 5,6,7,4'-OH (σκουτελαρεΐνη), 5,6,7,8,4'-OH (ισοσκουτελαρεΐνη). Φλαβονόνες: 5,7,3'-OH-4-OMe (εσπερετίνη).

O- γλυκοσίδες φλαβονών: 5,7,4'-OH-7-O-β-D-γλυκοσίδης (κοσμοσίνη), 5,7,3',4'-OH-7-O-β-D-γλυκοσίδης (κυναροσίδης), 5,7,3',4'-OH-7-O-β-D-γλυκουρονίδιο, 5,7,3',4'-OH-3'-O-β-D- γλυκουρονίδιο, 5,6,7,3',4'-OH-7-O-β-D-γλυκοσίδης, 5,6,7,3',4'-OH-7-O-β-D-γλυκουρονίδιο, 5,6,7,4'-OH-6-5,7,3',4'-OH-7-γλυκοσίδης (ομοπλαντα-γενίνη), 5,7,4'-OH-6-C-β-D-γκλυκοσυλ-8-C-β-D-γκλυκοσυλ (βισενίνη-2) .

Φαινολικά οξέα

Λόγω του μεγάλου αριθμού των φαινολικών οξέων που ανιχνεύθηκαν σε είδη *Salvia* ενδεικτικά αναφέρουμε τα ακόλουθα:

Salvia officinalis: καφεϊκό οξύ , ροσμαρινικό οξύ, cis-p-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύλ-)-β-D-γλυκοπυρανοσίδιο, trans-p-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύλ-)-β-D-γλυκοπυρανοσίδιο , σαλβιανολικό οξύ I, σαλβιανολικό οξύ K, σαζεκουμαρίνη, φερουλικό οξύ (Κουλάδη Μ, 2005)

1.5.2. Μέντα (*Mentha spp.*)

Βοτανικά στοιχεία

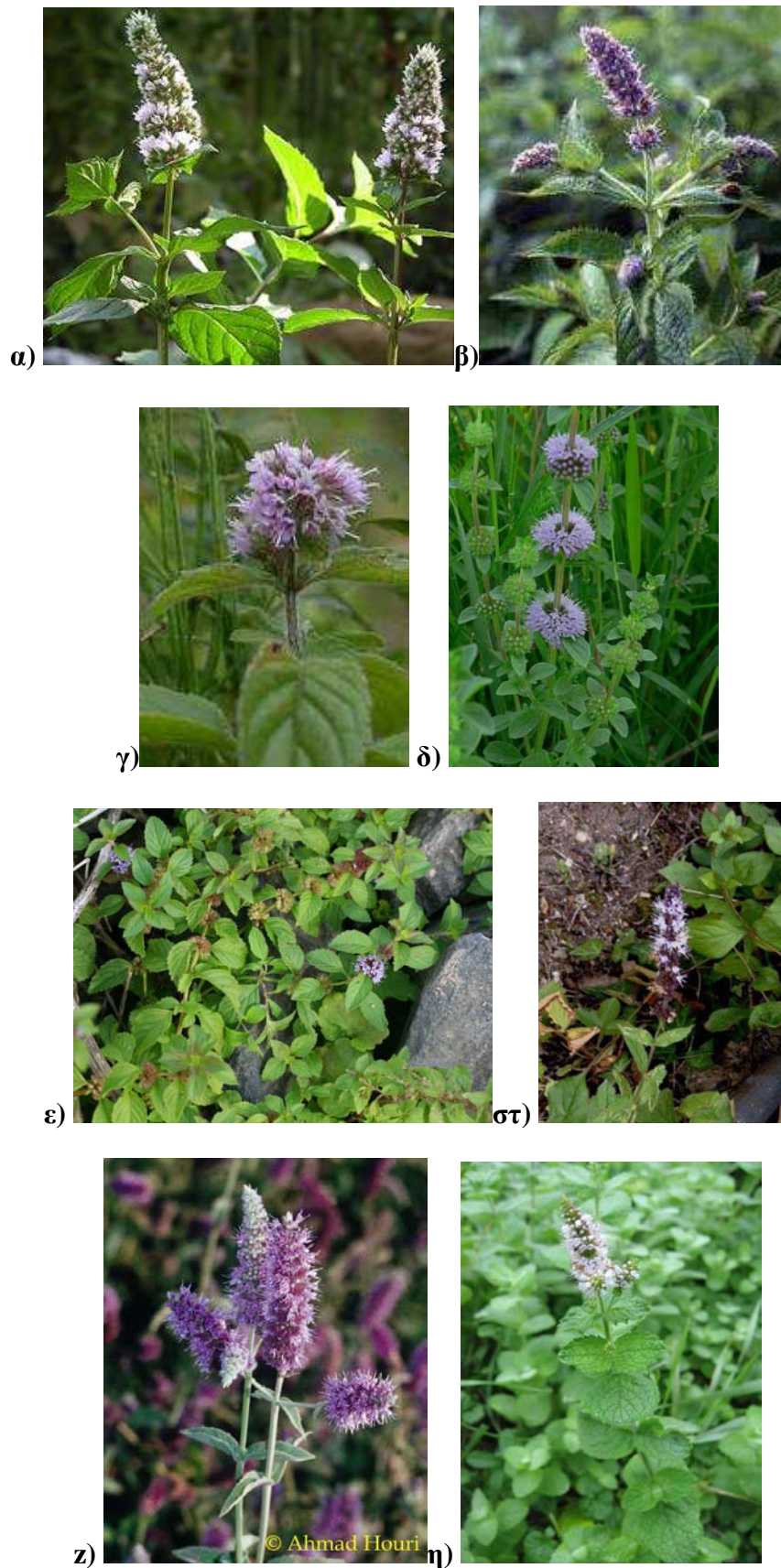
Η Μέντα ανήκει στην οικογένεια των Χειλανθών ή Λαμιδών (*Labiatae* ή *Lamiaceae*). Τα φυτά αυτά ευδοκιμούν στα θερμά και ξηρά κλίματα και φέρουν αδενώδεις τρίχες στα φύλλα και στους βλαστούς. Οι τρίχες αυτές εκκρίνουν αιθέρια έλαια. Οι βλαστοί των φυτών αυτών είναι τετράγωνοι (εκτός από τα φυτά που έρπουν) και φέρουν φύλλα αντίθετα, σταυρωτά ή κατά σπονδύλους, συνήθως απλά, χωρίς παράφυλλα. Όλα τα είδη του γένους *Mentha*, άγρια και καλλιεργούμενα αναδίδουν ένα χαρακτηριστικό, έντονο άρωμα, που οφείλεται σε ένα από τα κύρια αιθέρια έλαια του φυτού, που υπάρχει στα φύλλα και στα στελέχη και περιέχει μινθόλη (menthol) που είναι ένα τερπενοειδές. (Kokkini, 2003).

Το γένος *Mentha* είναι ιθαγενές της κεντρικής Ευρώπης, λόγω του μεγάλου οικονομικού ενδιαφέροντος που παρουσιάζει, τώρα πλέον έχει προσαρμοστεί και καλλιεργείται ευρύτατα και σε άλλες περιοχές του κόσμου, στις Η.Π.Α., στον Καναδά, στην Ασία και Β. Αφρική. Στην Ελλάδα, λόγω της μεγάλης γεωκλιματικής ποικιλομορφίας απαντάται σε όλη την έκταση της χώρας. Τα κυριότερα είδη μέντας που συναντώνται στον Ελλαδικό χώρο είναι:

- ***Mentha piperita*** (Μέντα η πιπερώδης) είναι προϊόν διασταύρωσης των ειδών μέντα η πράσινη (δυόσμος) και μέντα η υδροχαρής, που σταθεροποιήθηκε εξαιτίας του πολλαπλασιασμού της με ριζώματα. Είναι φυτό πολυετές, ύψους μέχρι 80 εκατοστά. Έχει βλαστό όρθιο, τετραγωνικό, χνουδωτό. Τα φύλλα είναι ωοειδή - στρογγυλά, επιφυή, τεφρόασπρα, χνουδωτά στην κάτω επιφάνεια. Τα άνθη είναι σε ακραία στάχυα, χρώματος άσπρου ή ρόδινου. Είναι αυτοφυές σε υγρά μέρη και στις όχθες ποταμών και ρυακιών. Συλλέγεται το υπέργειο τμήμα του φυτού, όταν αυτό βρίσκεται σε πλήρη άνθηση. Από τα φύλλα και από τα άνθη παίρνουμε το λάδι που περιέχει μινθόλη.
- ***Mentha viridis***, (πράσινη μέντα) κοινώς ο δυόσμος ή βάλσαμο, ονομάζεται και ρωμαϊκή μέντα.
- ***Mentha pulegium*** (μέντα η πουλέγιος), κοινή ονομασία φλισκούνι, βληχώνι, φλεσκούνι ή βληχούνι. Είναι φυτό πολυετές. ύψους μέχρι 20 εκατοστά. Έχει βλαστό όρθιο ή πλαγιαστό, λίγο τριχωτό ή σχεδόν λείο, πρασινωπό. Τα

φύλλα είναι μικρά, ωοειδή ή επιμήκη, με μικρό μίσχο. Τα άνθη βρίσκονται σε μασχαλιαίους σπονδύλους, χρώματος ρόδινου ή ιώδους. Η άνθηση αρχίζει τον Ιούνιο και διαρκεί μέχρι και τον Οκτώβριο. Το αιθέριο έλαιο της έχει ως κύριο συστατικό του μια κετόνη, την πουλεγόνη, αλλά περιέχει και μινθόνη, ισομινθόνη, L-πινένιο, L-λιμονένιο, διπεντένιο, μινθόλη, και άλλα συστατικά.

- ***Mentha longifolia*** (κοινώς Αγριοδυσόσμος) Αναπτύσσεται σε κοίτες ρυακιών, σε υγρούς τόπους. Συστατικά-ουσίες: Φλαβονοειδή: λουτεολίνη, απιγενίνη, ταννίνες, τριτερπένια: ουρσολικό οξύ, ολεανολικό οξύ, αιθέριο έλαιο: πινένια, λεμονένιο, φελλανδρένιο, καδινένιο, πουλεγόνη, κινεόλη, D-μινθόλη, (-)-μινθόνη, πιπεριτόνη, ιασμόνη, μινθοφουράνιο.
- Η ***Mentha aquatica*** είναι ένα πολυετές φυτό, εγγενές στην Ευρώπη και την Ασία, τώρα εξαπλωθεί σχεδόν σε όλο τον κόσμο. Όπως υποδηλώνει το όνομα, αναπτύσσεται κατά μήκος των όχθων ρυακιών, ποταμών, λιμνών, φραγμάτων, καναλιών, και υγρών λιβαδιών έως 1200 m (Maria Luisa Sotti, 1989) Προτιμά ελαφρώς όξινα εδάφη από ασβεστολιθικά εδάφη και τυρφώδη. Υβριδοποίηση μαζί με *Mentha spicata* (Δυσόσμος) δίνει *Mentha piperita* (Peppermint), στείρα υβρίδια.
- Η ***Mentha arvensis***, είναι διαδεδομένη στους κάμπους και στους αγρούς.
- Η ***Mentha microphylla***, με χαρακτηριστικά μικρά φύλλα.
- ***Mentha Rotundifolia***, Γνωστή επίσης και ως Γλήχων, Γλυφώνι ή Καλαμίθρα. Είναι φυτό πολυετές, ύψους μέχρι 70 εκατοστά. Έχει βλαστό όρθιο, με πολύ άσπρο χνούδι, τετραγωνικό. Τα φύλλα είναι επιφυή, ωοειδή - επιμήκη ή λογχοειδή, πριονωτά, άσπρα χνουδωτά τουλάχιστον στην κάτω επιφάνεια. Τα άνθη είναι σε ακραίους κυλινδρικούς βότρους, χρώματος ρόδινου ή ιώδους. Ανθίζει το καλοκαίρι αλλά συλλέγεται το φθινόπωρο. Είναι ποώδες ημι-αυτόφυτο και συναντάται σε χέρσες περιοχές και αναχώματα σαν αγριόχορτο, αλλά εύκολα καλλιεργείται επίσης και σε κήπους (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. α) *Mentha piperita*, β) *Mentha longifolia*, γ) *Mentha aquatica*, δ) *Mentha pulegium*, ε) *Mentha arvensis*, στ) *Mentha viridis*, ζ) *Mentha microphylla*, η) *Mentha rotundifolia*

Βιοδραστικά στοιχεία και βιολογικές ιδιότητες

Η χρήση των ειδών μέντας στην παραδοσιακή και τη συμβατική ιατρική οφείλεται ως επί το πλείστον στην παρουσία δύο κατηγοριών βιομορίων:

- α) στα μονοτερπένια που βρίσκονται κυρίως στα αιθέρια έλαια
- β) στις διάφορες φαινολικές ενώσεις.

Τα αιθέρια έλαια είναι γνωστό ότι δρουν ως αντιμικροβιακά, αντισπασμωδικά, διαλύουν τα αέρια του στομάχου, και αντιικών παραγόντων. Επιπλέον, αιθέρια έλαια από διάφορα είδη μέντας έχουν τα πρόσφατα χαρακτηριστεί ως φυσικά αντιοξειδωτικά.

Η πιο σημαντική κατηγορία πολυφαινόλων στα διάφορα είδη Μέντας είναι τα φλαβονοειδή. Τα διάφορα είδη χαρακτηρίζονται από την παρουσία συγκεκριμένων λιπόφιλων φλαβονοειδών. Οι φαινολικές ενώσεις της μέντας διαπιστώθηκε ότι δημιουργούν ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικής δράσης: αντιοξειδωτική, κυτταροπροστατευτικών, κατά του έλκους ηπατοπροστατευτικό, χημειοπροστατευτική, αντιφλεγμονώδη, αντιδιαβητογόνος κ.λπ. Ωστόσο, εκτός από θεραπευτικές ιδιότητες ορισμένων ειδών μέντας μπορεί να εμφανίζουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου (Mimica-dukic N και συν., 2008). Πρέπει να αναφέρουμε εδώ ότι το είδος περιέχει πουλεγόνη σε μεγάλη αναλογία σε σχέση με τα άλλα συστατικά, το οποίο είναι τοξικό και έχει προκαλέσει το θάνατο, μιας και χρησιμοποιούνταν σαν εκτρωτικό.

Η μινθόλη αποτελεί το πιο άφθονο και ίσως το σημαντικότερο συστατικό της μέντας χρησιμοποιείται για φαρμακευτικούς και διατροφικούς σκοπούς. Η μινθόλη θεωρείται ότι παρουσιάζει τις παρακάτω δράσεις, αντιμικροβιακή (κανένα βακτήριο δεν ζει πάνω από ώρα ακόμα και σε αραιότατο παρασκεύασμά της), τονωτική, αντισπασμωδική, αναλγητική, καρδιοτονωτική, αντιβηχική και αντιασθματική, ηρεμιστική για το στομάχι αλλά και κατά των ιλίγγων, της ταχυκαρδίας και των νευρικών διαταραχών (Zheng, 2001). Τα είδη του γένους αυτού παρουσιάζουν ένα εξαιρετικά μεγάλο χημικό πολυμορφισμό, δηλαδή άτομα του ίδιου είδους παράγουν αιθέρια έλαια με διαφορετική ποιοτική σύσταση, με τους παρακάτω 4 χημειότυπους , με βάση τα κύρια συστατικά που παρουσιάζουν στα αιθέρια έλαια τους:

- Χημειότυπος 1:Κύριο συστατικό αιθέριων: Λιναλοόλη ή και οξικός λιναλυλεστέρας.

- Χημειότυπος 2:Κύρια συστατικά αιθέριων ελαίων: Καρβόνη και διυδροκαρβόνη.
- Χημειότυπος 3:Κύρια συστατικά αιθέριων ελαίων: Μινθόλη, ισομινθόνη.
- Χημειότυπος 4: Κύρια συστατικά αιθέριων ελαίων: Εποξείδιο της πιπεριτόνης ή εποξείδιο της πιπεριτενόνης (Kokkini, 2000).

Σύμφωνα με μελέτες, τα κύρια χημικά συστατικά σε αιθέρια έλαια από πολλά είδη μέντας, όπως *Mentha. arvensis*, *Mentha. piperita*, *Mentha. longifolia* και *Mentha. spicata* (καλοκαιρινής και χειμωνιάτικης καλλιέργειας) ήταν η μινθόλη, μινθόνη., πιπεριτινόνη, οξείδιο και καρβόνη, αντίστοιχα. Τα υπό δοκιμή αιθέρια έλαια και τα βασικά συστατικά τους, παρουσίασαν αξιοσημείωτη αντιμικροβιακή δράση ενάντια στους περισσότερους παθογόνους παράγοντες των φυτών και των ανθρώπων που μελετήθηκαν. Τα υπό δοκιμή αιθέρια έλαια παρουσίασαν επίσης καλό δυναμικό κύτταρο-τοξικότητας (Hussain AI, 2010).

Έρευνα έδειξε ότι το αιθέριο έλαιο του *Mentha pulegium L.* έχει μια ισχυρή αντιμικροβιακή δράση. Ανάλυση του αιθέριου ελαίου αποκάλυψε την παρουσία πιπεριτόνης, πιπεριτινόνης, α-τερπινεόλης, και πουλεγόνης, ως τα κυριότερα συστατικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική δράση κατά των μικροοργανισμών έναντι κυρίως Gram-θετικών βακτηρίων με διάμετρο ζωνών αναστολής και ελάχιστη ανασταλτική τιμή συγκέντρωσης της τάξης του 8-21mm και 0,25-4 μl/ml, αντίστοιχα, ενώ τα λιγότερο ευπαθή ήταν τα Gram-αρνητικά βακτήρια, όπως *Escherichia coli* (Mohaddese Mahboubi και συν., 2008). Το αιθέριο έλαιο έδειξε ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι 30 μικροοργανισμών που εξετάστηκαν, ενώ το εκχύλισμα δεν είχε σχεδόν καμία δράση (Gulluce M και συν. 2007).

1.5.3. Τσάι του βουνού (*Sideritis spp*)

Βοτανικά στοιχεία

Τα φυτά του γένους *Sideritis* είναι μέλη της οικογένειας Χειλανθών ή Λαμιδών (*Labiatae* ή *Lamiaceae*) και είναι δικοτυλήδονα. Στην Ελλάδα είναι γνωστό σαν τσάι του βουνού και ανήκει στα αυτοφυή είδη, αναφέρεται από την αρχαιότητα από το Θεόφραστο (372-287 π.Χ.) και τον Διοσκουρίδη (10 μ.Χ. αιώνα). Το επιστημονικό του όνομα *Sideritis* προέρχεται από τη λέξη σίδηρος και κατά μια εκδοχή δόθηκε στο φυτό, εξαιτίας της ικανότητάς του να θεραπεύει τις πληγές που προκαλούνται από σιδερένια αντικείμενα. Σύμφωνα με άλλη, επειδή αποτελεί φυσική πηγή σιδήρου, αφού στα ροφήματα που παρασκευάζονται από αυτό περιέχεται αρκετός σίδηρος. Μια τρίτη άποψη υποστηρίζει ότι η ονομασία του οφείλεται στο σχήμα των δοντιών του κάλυκα, που μοιάζουν με αιχμή λόγχης (Γκολιαρης Α 1999).

Είναι πολυετής ή μονοετής πόα και ο βλαστός τους είναι απλός ή διακλαδισμένος σε δευτερεύοντες. Τα φύλλα, σε σχήμα λόγχης, είναι οδοντωτά ή ακέραια και τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα, λευκά ή κίτρινα, σε ταξιανθία στάχους (Γκολιαρης Α 1984, 1987).

Το γένος *Sideritis* της οικογένειας των Χειλανθών περιλαμβάνει περίπου 140 γνωστά είδη, και υποείδη που εμφανίζονται κυρίως στις παραμεσόγειες χώρες. (Willis, 1966, Tutin και συν., 1972, Strid και Tan, 1991). Τα φυτά αυτού του γένους χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραδοσιακή ιατρική στην Ελλάδα και την Ευρώπη, λόγω των αντιφλεγμονωδών, αντιρρευματικών, και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων (Quer, 1962, Diaz και συν., 1988) οι οποίες αποδίδονται σε φαινολικές και τερπενοειδείς ενώσεις (Koleva και συν., 2003? Aboutabl και συν., 2002, Akcos και συν., 1999, Pang και συν., 1996, Alcaraz και συν., 1989).

Τα ενδημικά είδη της Ελλάδας είναι:

- *Sideritis athoa* (Άθως), κοινή ονομασία Τσάι Βλάχικο.
- *Sideritis scardica* (Όλυμπος), κοινή ονομασία Τσάι του Ολύμπου.
- *Sideritis raeseri* (Παρνασσός), κοινή ονομασία Τσάι του Παρνασσού ή τσάι του βελουχιού.
- *Sideritis clandestina* (Ταύγετος), κοινή ονομασία Τσάι του Μαλεβού ή τσάι Ταύγετου.
- *Sideritis Euboea* (Εύβοια) ή τσάι απ' το Δέλφι και

- *Sideritis syriaca* (Κρήτη) κοινή ονομασία **Τσάι της Κρήτης** γνωστό και ως Μαλοτήρα ή Καλοκοιμηθιά. (Papanicolaou και συν. 1982) (Εικόνα 4).



Εικόνα 4. α) *Sideritis athoa*, β) *Sideritis scardica*, γ) *Sideritis raeseri*, δ) *Sideritis clandestina*,
ε) *Sideritis Euboea*, στ) *Sideritis syriaca*

Βιοδραστικά στοιχεία και βιολογικές ιδιότητες

Τα εκχυλίσματα και τα περισσότερα αιθέρια έλαια του γένους *Sideritis* είναι βιοδραστικά, κυρίως λόγω της περιεκτικότητας τους σε φλαβονοειδή και τερπενοειδή (Papanicolaou και συν. 1984; Samaras και συν. 2002). Πρόσφατες μελέτες δείχνουν ότι έχουν αντιφλεγμονώδη αναλγητική, αντιμικροβιακή και αντιοξειδωτική δράση (Menghini και συν., 2005). Μελέτη σε εκχύλισμα τσαγιού έδειξε ότι η ECGC, (*digallate theaflavin*) ανέστειλε την ανάπτυξη ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών του *Staphylococcus aureus* (Toda M και συν., 1991). Για την αναστολή της ανάπτυξης Gram-αρνητικών βακτηρίων (*E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pr.mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, και *Se.marcescens*) ήταν αναγκαία υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης (MIC=800μg/mL) σε σύγκριση με συγκεντρώσεις (MIC 50-100μg/mL από την (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)) που χρειάστηκαν για την αναστολή αρκετών στελεχών σταφυλόκοκκων (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus hominis*, και *Staphylococcus haemolyticus*) (Yoda, Y 2004).

Οι συγγραφείς συμπεραίνουν, ότι η δομή του κυτταρικού τοιχώματος καθώς επίσης και η διαφορετική συγγένεια του ECGC με τα συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος (Πεπτιδογλυκάνες), ίσως να ρυθμίζουν τις διάφορες ευαισθησίες των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων έναντι της ECGC. Αυτές οι μελέτες δείχνουν ότι οι κατεχίνες του τσαγιού, theaflavins, και τα εκχυλίσματα τσαγιού που περιέχουν και τις δύο κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων, παρουσίασαν ισχυρή αντιβακτηριακή δραστηριότητα κατά της τροφικών παθογόνων βακτηρίων, που προκαλούν αλλοίωση των τροφίμων, και παθογόνων βακτηρίων που προκαλούν μολυσματικές ασθένειες στον άνθρωπο.

Η φαινολική σύσταση 27 ειδών του γένους *Sideritis*, μελετήθηκε από τους Tunalier και συν., (2004). Από την ανάλυση αυτή ταυτοποιήθηκαν τρεις κατηγορίες φαινολικών ομάδων, βενζοϊκά οξέα, υδροξυκιναμικά οξέα και φλαβονοειδή. Σε άλλη μελέτη, από το μεθανολικό εκχύλισμα του υποείδους *Sideritis raeseri subsp. raeseri*, απομονώθηκαν εννέα διαφορετικές δομές φλαβονών του τύπου 5,8-dihydroxy-flavone- 7-o-allosylglucosides, (Gabrieli και συν., 2005).

Η βιβλιογραφία δείχνει ότι α) η γεωγραφική προέλευση, β) η σύνθεση του εδάφους, γ) οι διαφορές στη σύνθεση των διαφόρων φύλλων, δ) η ώρα της συγκομιδής, ε) η μετασυλλεκτική αποθήκευση και διαχείριση, και στ) η φυσική δομή των διαφόρων

φύλλων πιθανόν να επηρεάσουν η σύνθεση των φύλλων τσαγιού. Επίσης, σε αυτή την μεταβλητότητα, συμβάλλει και η ευαισθησία των ενώσεων τσαγιού στην εκχύλιση από διαφορετικούς διαλύτες (Lin, Y και συν., 2003, Astill, R και συν., 2001, Wang, H και συν., 2000).

Για παράδειγμα, από 77 είδη τσαγιού που πωλούνται στις Ηνωμένες Πολιτείες, εξήχθησαν σημαντικά μεγαλύτερες ποσότητες, μεμονωμένων και συνολικών φλαβονοειδών (κατεχίνες και theaflavins) με 80% αιθανόλη/νερό σε 60°C για 15 λεπτά, από ό, τι με βραστό νερό για 5 λεπτά (Friedman M και συν., 2006, Chou C, 1999).

Τα φυτά του γένους *Sideritis* έχουν όπως αναφέρθηκε αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, καθώς και ήπια ανασταλτική δράση έναντι της *Candida albicans*. Η δράση αυτή οφείλεται σε ορισμένα διτερπένια με παρουσία συστήματος 1,3-διόλης και μιας ακετοξυ-ομάδας (Diaz και συν., 1987, Rodriguez και συν., 1994).

Μια συγκεντρωτική φυτοχημική ανάλυση σε δεκαπέντε διαφορετικά είδη του *Sideritis* παρουσιάζει το διαχωρισμό εννέα φλαβονοειδών, τα οποία περιέχονται με διαφορετικές αναλογίες σε κάθε ένα φυτικό εκχύλισμα και μεταξύ άλλων ανιχνεύθηκαν έξι φλαβονοειδή τύπου λουτεολίνης: λουτεολίνη, χρυσοεριόλη, κισιλιόλη, σιδεριτοφλαβόνη, κισιλινεόλη και 5,4'-διυδροξυ-6,7,8,3'-τετραμέθοξυ φλαβόνη, και τρεις τύπου απιγενίνης: απιγενίνη, κισιμαριτίνη, ξανθομικρόλη (Barberan, 1985).

Η βιβλιογραφία δείχνει ότι η γεωγραφική προέλευση, η σύνθεση του εδάφους, οι διαφορές στη σύνθεση των διαφόρων φύλλων, η ώρα της συγκομιδής, η μετασυλλεκτική αποθήκευση και διαχείριση, και η φυσική δομή των διαφόρων φύλλων πιθανόν να επηρεάσουν η σύνθεση των φύλλων τσαγιού. Επίσης, σε αυτή την μεταβλητότητα συμβάλλουν και η ευαισθησία των ενώσεων τσαγιού στην εκχύλιση από διαφορετικούς διαλύτες (Lin, Y και συν., 2003, Astill R και συν., 2001, Wang H και συν., 2000).

1.6. Σκοπός του πειράματος

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιμικροβιακής και κατ' επέκταση της χημειοπροστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων ενδημικών ελληνικών ποικιλιών φασκόμηλου, μέντας και τσαγιού (του βουνού). Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν υδατικά, μεθανολικά και διχλωρομεθανολικά εκχυλίσματα όσο αφορά την αντιμικροβιακή δράση έναντι gram θετικών (*Staphylococcus aureus*) και gram αρνητικών (*Pseudomonas Aeruginosa* 1737, κλινικό στελέχος) βακτηριών. Για να μελετηθεί η αντιμικροβιακή ικανότητα των φυτικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν τρεις *in vitro* μέθοδοι εκτίμησης της αντιμικροβιακής ικανότητας. Και οι τρεις μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα των ουσιών να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων.

2. Υλικά και μέθοδοι

2.1. Υλικά μεθόδων

- Τρυβλία Petri (100mm)
- Μικροπλάκες 96-θέσεων (96-wells microplates)
- θρεπτικό υλικό Mueller Hinton Broth
- θρεπτικό υλικό Mueller-Hinton agar
- soft agar
- Δισκία 6mm (discs Whatman)
- Γυάλινα φιαλίδια (vials)
- Βαμβakoφόροι στυλεοί
- Λαβίδα
- Χάρακας,

2.1.2. Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αναλυτικού βαθμού καθαρότητας και ήταν προϊόντα των εταιρειών Merck (Γερμανία) και Sigma (Η.Π.Α.).

2.1.3. Εκχυλίσματα

Τα εκχυλίσματα, που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από αρωματικά φυτά (*Salvia spp.*, *Mentha spp.*, *Sideritis spp.*) της περιοχής του Κισσάβου. Τα εκχυλίσματα ήταν τριών τύπων, υδατικά, μεθανολικά και δίχλωρομεθανολικά και εξετάστηκαν τα παρακάτω είδη των προαναφερθέντων φυτών (Πίνακες 1,2, 3):

Πίνακας 1. Εκχυλίσματα Φασκόμηλου (*Salvia spp.*)

Κωδικός Εκχυλίσματος	Φυτό	Τύπος
020	<i>Salvia officinalis</i>	Μεθανολικό
021	<i>Salvia officinalis</i>	Υδατικό
024	<i>Salvia fruticosa</i>	Υδατικό
025	<i>Salvia sclarea</i>	Δίχλωρο μεθανολικό
026	<i>Salvia sclarea</i>	Μεθανολικό
027	<i>Salvia sclarea</i>	Υδατικό
030	<i>Salvia argentea</i>	Υδατικό
033	<i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	Υδατικό
035	<i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	Μεθανολικό
036	<i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	Υδατικό

Πίνακας 2. Εκχυλίσματα Μέντας (*Mentha spp.*)

Κωδικός Εκχυλίσματος	Φυτό	Τύπος
011	<i>Mentha aquatica</i>	Μεθανολικό
003	<i>Mentha microphylla</i>	Δίχλωρο μεθανολικό
007	<i>Mentha microphylla</i>	Υδατικό
011	<i>Mentha aquatica</i>	Μεθανολικό
013	<i>Mentha longifolia</i>	Δίχλωρο μεθανολικό
015	<i>Mentha longifolia</i>	Υδατικό
017	<i>Mentha pulegium</i>	Μεθανολικό
018	<i>Mentha pulegium</i>	Υδατικό

Πίνακας 3. Εκχυλίσματα τσαγιού (*Sideritis spp*)

<i>Κωδικός Εκχυλίσματος</i>	<i>Φυτό</i>	<i>Τύπος</i>
002	<i>Sideritis raeseri ssp. Attica</i>	Δίχλωρο μεθανολικό
004	<i>Sideritis raeseri ssp. Attica</i>	Υδατικό
039	<i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	Δίχλωρο μεθανολικό
040	<i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	Μεθανολικό
041	<i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	Υδατικό

2.1.4. Διαδικασία εκχύλισης

Τα υπέργεια τμήματα των φυτών, αποξηράνθηκαν και κονιορτοποιήθηκαν σε ειδικό μύλο. Ποσότητα των τμημάτων των φυτών χρησιμοποιήθηκε για εκχύλιση με μεθανόλη (2/1 v/v) και νερό (2/1 v/v), αιθανόλη και διχλωρομεθανόλη (2/1 v/v) σε ειδική συσκευή αυτόματης εκχύλισης. Κάθε εκχύλιση με τον αντίστοιχο διαλύτη επαναλήφθηκε τρεις φορές και κάθε εκχύλιση διαρκούσε 48 ώρες. Στην συνέχεια ακολούθησε απομάκρυνση του διαλύτη των εκχυλισμάτων υπό κενό.

2.2. Μέθοδοι

Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρεις in vitro μέθοδοι:

- i) Η Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δισκία (*disk diffusion method*).
- ii) Η Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (*wells diffusion method*).
- iii) Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*).

Οι δύο πρώτες μέθοδοι στηρίζονται στην αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων και είναι κατά βάση ποιοτικές. Η τρίτη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση της αντιμικροβιακής δράσης των εκχυλισμάτων.

2.2.1. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων με τη μέθοδο της *Disk Diffusion Susceptibility Testing* (Kirby-Bauer Method)

2.2.1.1. Αρχή της μεθόδου

Η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δισκία, *Disk Diffusion Susceptibility Testing* (Kirby-Bauer), (Bauer και συν., 1996) είναι μια από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες μεθόδους δοκιμής αντιμικροβιακής ευαισθησίας (AST) (Jorgensen και συν., 1998). Για τη μέθοδο αυτή υπάρχουν γενικώς αποδεκτά πρότυπα, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που εγκρίθηκαν από την Εθνική Επιτροπή των Η.Π.Α για τα Κλινικά Εργαστήρια (NCCLS) (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997). Οι μέθοδοι και τα ερμηνευτικά κριτήρια για την μεθοδολογία διάχυσης δίσκων έχουν δημοσιευτεί από το NCCLS στην Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility (1997), αναθεωρούνται και ενημερώνονται, όταν αυτό απαιτείται.

2.2.1.2. Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάζεται η καλλιέργεια των βακτηρίων χρησιμοποιώντας καλλιέργειες (*stock*) που διατηρούνται στους -80°C. Με μικροβιολογικό κρίκο επιστρώνεται μια μικρή ποσότητα βακτηρίων από το stock σε τριβλία με άγαρ. Οι αποικίες επωάζονται για 24 ώρες.

Επιλέγουμε τουλάχιστον 4 έως 5 καλά απομονωμένες αποικίες του ίδιου μορφολογικού τύπου από το τριβλίο με το άγαρ. Με ένα μικροβιολογικό κρίκο

(wireloop) μεταφέρουμε κάθε αποικία σε γυάλινα φιαλίδια που περιέχουν 5ml υγρού θρεπτικού (Mueller Hinton Broth) τα οποία τοποθετούνται σε επωαστήρα υπό ανάδευση (incubator shaker) στους 37°C για 16 ώρες. Στη συνέχεια η καλλιέργεια αραιώνεται μέχρι την παρασκευή μικροβιακού εναιωρήματος (inoculum) θολρότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου 10^8 cfu/ ml). Η μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) στα 600nm έγινε σε φασματοφωτόμετρο μέχρι να πετύχουμε τελική τιμή 0.132 που αντιστοιχεί σε 0.5 McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ ml). Εντός 15 min από την παρασκευή του μικροβιακού εναιωρήματος γίνεται ενοφθαλμισμός με 50μl σε τριβλία με θρεπτικό Mueller-Hinton agar χρησιμοποιώντας αποστειρωμένους βαμβακοφόρους στυλεούς περιστρέφοντας το πιάτο 60° για να εξασφαλίσουμε κάθε φορά μια ομαλή διανομή του εμβολίου.

Στη συνέχεια τοποθετούμε 4 αποστειρωμένους δίσκους (6mm) ομοιόμορφα (όχι σε μικρότερη απόσταση από 24mm από το κέντρο του ενός μέχρι το κέντρο του άλλου) στην επιφάνεια του τριβλίου άγαρ με τη χρησιμοποίηση μιας αποστειρωμένης λαβίδας.

Στους δίσκους με την πιπέτα προστέθηκαν:

- 10μl που περιέχουν 2,5mg εκχυλίσματος
- 10μl που περιέχουν 0,5mg εκχυλίσματος
- 10μl που περιέχουν νερό ή DMSO ή DCM (αρνητικό control)
- 10μl τετρακυκλίνης (θετικό control), συγκέντρωσης 20mg/ml.

Για την διάλυση των υδατικών εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, των μεθανολικών εκχυλισμάτων 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) και των διχλωρομεθανολικών διχλωρομεθάνιο (DCM).

Τοποθετούμε τα τριβλία σε επωαστήρα στους 35 °C για 16-18 hrs.

Μετά την επώαση εξετάζουμε κάθε τριβλίο Petri και μετράμε με χάρακα τις διαμέτρους (mm) των ζωνών αναστολής της ανάπτυξης των βακτηρίων.

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και για το κάθε βακτήριο.

2.2.2. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων με τη Μέθοδο Διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Wells-diffusion method)

2.2.2.1. Αρχή της μεθόδου - Πειραματική διαδικασία

Η δοκιμή ευαισθησίας των φυτικών εκχυλισμάτων με τη δεύτερη μέθοδο εξετάστηκε με βάση τη μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκι (Fernandez C και συν.,1986b, Carrascal 1978, Raman και συν.,2001).

Για τη δοκιμασία της μεθόδου ακολουθήθηκε η διαδικασία που αναφέρεται στη βιβλιογραφία (NCCLS, 1997, 1998, 2000). Συγκεκριμένα, αρχικά προετοιμάζεται μικροβιακό εναιώρημα (*inoculum*) με θολερότητα ίση με 0,5 McFarland (περίπου $1,5 \times 10^8$ cfu/ml). Στη συνέχεια ακολουθεί εμβολιασμός των βακτηριακών καλλιιεργειών στην επιφάνεια του Mueller Hinton άγαρ χρησιμοποιώντας έναν αποστειρωμένο βαμβακοφόρο στυλεό έτσι ώστε να έχουμε ομοιόμορφη κατανομή σε ολόκληρη την επιφάνεια του άγαρ στο τριβλίο Petri.

Αφού γίνει η προετοιμασία των τρυβλίων, στη συνέχεια με αποστειρωμένο γυάλινο εκπωματιστή δημιουργούμε 3 κοιλότητες (*wells*) διαμέτρου 6mm (O N Irobi και συν., 1996).

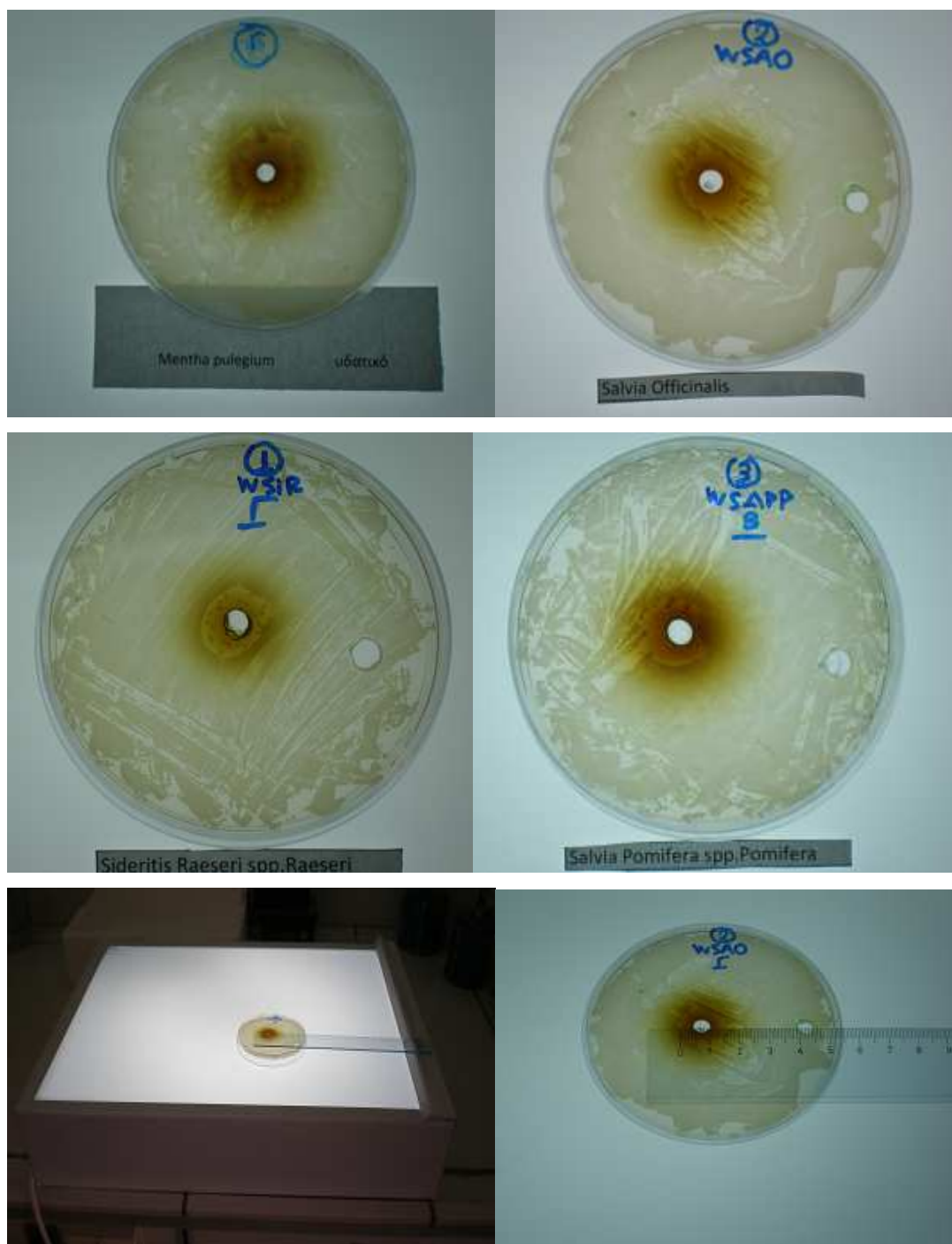
Στη κάθε κοιλότητα βάζουμε 10μl soft agar και το αφήνουμε να πήξει. Στη συνέχεια προστέθηκαν:

- 50μl που περιείχαν 10mg εκχυλίσματος.
- 50μl που περιείχαν νερό (αρνητικό control)
- 50μl τετρακυκλίνης (θετικό control), συγκέντρωσης 20mg/ml

Τοποθετούμε τα τρυβλία σε επωαστήρα στους 35 °C για 16-18 hrs.

Μετά την επώαση εξετάζουμε κάθε τρυβλίο Petri και μετράμε με χάρακα τις διαμέτρους (mm) των ζωνών πλήρους αναστολή της ανάπτυξης των βακτηρίων (Εικόνα 5).

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και για το κάθε βακτήριο.



Εικόνα 5. Χαρακτηριστικά αναστολής με την μέθοδο διάχυσης σε πηγαδάκια.

2.2.3. Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλισμάτων μέσω του προσδιορισμού της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (*minimum inhibitory concentration*) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (*microtiter plates*).

2.2.3.1. Αρχή της μεθόδου

Η τρίτη *in vitro* μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) (Eloff, J. N. 1998) έγινε σε αποστειρωμένες μικροπλάκες (*microplates*) πολυστερίνης 96 θέσεων (96-wells) η καθεμία.. (Amsterdam, 1996).

Για τις υγρές καλλιέργειες, το MIC ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αντιμικροβιακού παράγοντα, στην οποία δεν ανιχνεύεται καμιά αύξηση, δηλαδή δεν παρουσιάζεται θολερότητα η οποία παρατηρείται οπτικά (Mokhlasur, 2004).

Για το ScanMIC, οι μικροπλάκες τοποθετήθηκαν σε *microplate reader* (ELx808 Absorbance Microplate Reader, BioTek), συνδεδεμένο με έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η ανάλυση των οπτικών απορροφήσεων των καλλιεργειών έγινε με το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software* (Biotek).

2.2.3.2 Πειραματική διαδικασία

Αρχικά προετοιμάστηκε μικροβιακό ελαιώρημα θολερότητας ίση με 0,5 McFarland (περίπου 10^8 cfu/ml) (NCCLS 1997, 1998, 2000). Στη συνέχεια έγινε αραίωση του μικροβιακού ελαιωρήματος μέχρι η πυκνότητα να γίνει ίση με 0,05 McFarland (περίπου 5×10^4 cfu/ml).

Για κάθε εκχύλισμα δοκιμαστήκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις (8mg/ml, 6mg/ml και 4mg/ml, 3mg/ml, 2,5mg/ml, και 2mg/ml) για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης. (Πίνακας 4)

Για κάθε εκχύλισμα, χρησιμοποιήθηκαν:

3 πηγαδάκια (*wells*), στο καθένα από τα οποία προστέθηκε:

- 20μl καλλιέργειας ,
- 30μl εκχυλίσματος και
- 150μl θρεπτικού υλικού (Mueller Hinton Broth)

3 πηγαδάκια (αρνητικό control) στα οποία προστέθηκαν:

- 20μl καλλιέργειας ,

- 30μl αποστειρωμένου απιονισμένου νερού και
- 150μl θρεπτικού υλικού (Mueller Hinton Broth)

3 πηγαδάκια (θετικό control) στα οποία προστέθηκαν:

- 20μl καλλιέργειας
- 30μl τετρακυκλίνης (θετικό control), συγκέντρωσης 20mg/ml και
- 150μl θρεπτικού υλικού (Mueller Hinton Broth)

Επακολούθησε ανάδευση με την πιπέτα. Η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε στο *ELx808 Absorbance Microplate Reader* (Εικόνα 6). και έγινε μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (*OD*) στα 630 nm. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν και καταγράφηκαν από το λογισμικό *Gen5™ Data Analysis Software*. Στη συνέχεια η μικροπλακέτα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα υπό ανάδευση (*incubator shaker*) στους 37° C για 16hrs. Μετά από την επώαση των 16 ωρών ακολούθησε μια δεύτερη ανάγνωση από το *Absorbance Microplate Reader*.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα των δυο μετρήσεων προσδιορίσαμε την ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση στην οποία δεν υπήρξε βακτηριακή ανάπτυξη.

Τα πηγαδάκια στα οποία παρουσιάστηκε αναστολή της ανάπτυξης ήταν διαυγή ενώ σε αυτά που είχαμε ανάπτυξη ήταν θολά (Εικόνα 7).

Όλα τα δείγματα εξετάζονται εις τριπλούν τουλάχιστον για το κάθε φυτικό εκχύλισμα και για την κάθε συγκέντρωση.

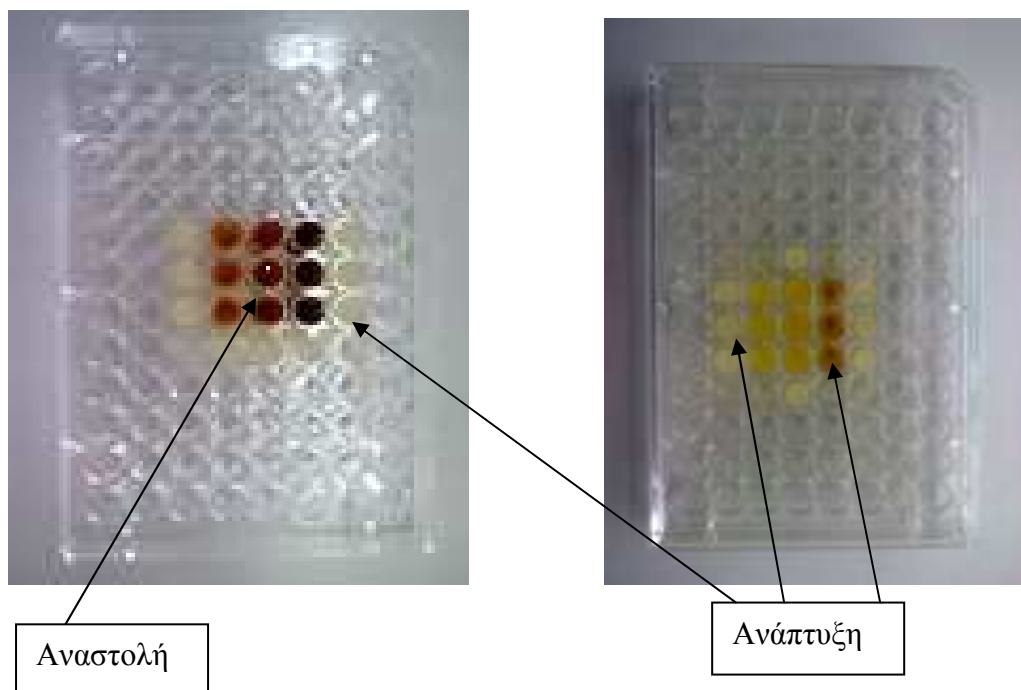


Εικόνα 6. *ELx808 Absorbance Microplate Reader*

Πίνακας 4. Η διαδοχική σειρά προσθήκης και ποσότητες των εκχυλισμάτων.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
					CONTROL	CONTROL	CONTROL					
B					8mg/ml	8mg/ml	8mg/ml					
C				CONTROL	6mg/ml	6mg/ml	6mg/ml	CONTROL				
D				CONTROL	4mg/ml	4mg/ml	4mg/ml	CONTROL				
E				CONTROL	CONTROL	CONTROL	CONTROL	CONTROL				
F												
G												
H												

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					CONTROL	CONTROL	CONTROL					
B					3mg/ml	3mg/ml	3mg/ml					
C				CONTROL	2,5mg/ml	2,5mg/ml	2,5mg/ml	CONTROL				
D				CONTROL	2mg/ml	2mg/ml	2mg/ml	CONTROL				
E				CONTROL	CONTROL	CONTROL	CONTROL	CONTROL				
F												
G												
H												



Εικόνα 7. Χαρακτηριστικά αναστολής και ανάπτυξης σε *microtiter plates*

2.2.4. Στατιστική ανάλυση

Για την στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων υπολογιζόταν η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση (*Standard Deviation*) των τιμών της διαμέτρου (mm) των ζωνών αναστολής της ανάπτυξης.

3. Αποτελέσματα

3.1. . Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλίσμάτων μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με δισκία.

Disk Diffusion Susceptibility Testing (Kirby-Bauer Method)

3.1.1. Εκχυλίσματα φασκόμηλου

Συνολικά μελετήθηκαν 10 εκχυλίσματα φασκόμηλου σε συγκέντρωση 2,5mg και 0,5mg αντίστοιχα. Από αυτά παρουσίασαν αναστολή ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* 4 εκχυλίσματα. στη ποσότητα των 2,5mg.

Το πιο ισχυρό ήταν το υδατικό εκχύλισμα, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia Pomifera ssp.calycina* με μέσο όρο διαμέτρου αναστολής της ανάπτυξης (ΔΑΑ) **4,33mm** ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα από τη *Salvia officinalis* με ΔΑΑ **4,33mm**, το υδατικό εκχύλισμα από τη *Salvia Pomifera ssp.pomifera* με ΔΑΑ **3,66mm** (Πίνακας 5).

Κανένα από τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασε ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης της *Pseudomonas aeruginosa*.

Πίνακας 5. Επίδραση των εκχυλίσμάτων φασκόμηλου στην αναστολής της ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* με την Μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με δισκία.

<i>Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δισκία</i>	
Εκχύλισμα 2,5mg	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)
<i>Salvia officinalis</i>	4,33\pm0,57
<i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	3,67\pm0,57
<i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	4,33\pm0,57

a) 2.5mg/disk b) 10 μ l/disc c) diameter discs Whatman 6mm

d) Η διάμετρος του δισκίου δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

3.1.2. Εκχυλίσματα μέντας

Συνολικά μελετήθηκαν 8 εκχυλίσματα μέντας σε συγκέντρωση 2,5mg και 0,5mg αντίστοιχα. Από αυτά παρουσίασε αναστολή ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* μόνο το υδατικό εκχύλισμα, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Mentha pulegium* με μέσο όρο διαμέτρου αναστολής της ανάπτυξης **4,67mm** στη ποσότητα των 2,5mg. (Πίνακας 6)

Κανένα από τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασε ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης της *Pseudomonas aeruginosa*.

Πίνακας 6. Επίδραση των εκχυλισμάτων μέντας στην αναστολή της ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* με την Μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με δισκία.

Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δισκία	
Εκχύλισμα 2,5mg	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)
<i>Metnha pulegium</i>	4,67±1,15

a) 2.5mg/disk b) 10 µl/disc c) diameter discs Whatman 6mm

d) Η διάμετρος του δισκίου δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

3.1.3. Εκχυλίσματα τσαγιού.

Συνολικά μελετήθηκαν 5 εκχυλίσματα τσαγιού σε συγκέντρωση 2,5mg και 0,5mg αντίστοιχα. Από αυτά παρουσίασε αναστολή ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* ένα εκχύλισμα, το υδατικό εκχύλισμα που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Sideritis raeseri ssp.raeseri* με μέσο όρο διαμέτρου αναστολής της ανάπτυξης **2,67mm** στη ποσότητα των 2,5mg (Πίνακας 7).

Κανένα από τα εκχυλίσματα δεν παρουσίασε ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης της *Pseudomonas aeruginosa*.

Πίνακας 7. Επίδραση των εκχυλισμάτων τσαγιού στην αναστολή της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* με την Μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με δίσκία.

<i>Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δίσκία</i>	
Εκχύλισμα 2,5mg	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)
<i>Sideritis raeseri ssp.raeseri</i>	2,67±0,57

a) 2.5mg/disk b) 10 µl/disc c) diameter discs Whatman 6mm

d) Η διάμετρος του δισκίου δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

3.1.4. Συνολικά αποτελέσματα της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με δισκία *Disk Diffusion Susceptibility Testing (Kirby-Bauer Method)*

Από την μελέτη των συνολικά 23 εκχυλίσμάτων των αρωματικών κατά βάση φυτών, προέκυψε ότι 6 από αυτά τα εκχυλίσματα, όλα υδατικά παρουσίασαν αναστολή ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* στη ποσότητα των 2,5mg, ενώ κανένα από αυτά δεν παρουσίασε ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης και στις δυο συγκεντρώσεις της *Pseudomonas aeruginosa*. Το πιο ισχυρό ήταν το υδατικό εκχύλισμα, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Mentha pulegium* με μέσο όρο διαμέτρου αναστολής της ανάπτυξης (ΔΑΑ) **4,67mm** και ακολουθούν το υδατικό εκχύλισμα από τη *Salvia Pomifera ssp.calycina* με ΔΑΑ **4,33mm**, το υδατικό εκχύλισμα από τη *Salvia officinalis* με ΔΑΑ **4,33mm** και το υδατικό εκχύλισμα από τη *Salvia Pomifera ssp.pomifera* με ΔΑΑ **3,66mm** (Πίνακας 8). Αξιοσημείωτο είναι ότι όλα τα εκχυλίσματα που παρουσίασαν ικανότητα αναστολής της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* είναι υδατικά.

Πίνακας 8. Συνολικός πίνακας επίδρασης των εκχυλίσμάτων στην αναστολή της ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με δισκία

<i>Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δισκία</i>	
Εκχύλισμα 2,5mg	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)
<i>Salvia officinalis</i>	4,33\pm0,57
<i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	3,67\pm0,57
<i>Metnha pulegium</i>	4,67\pm1,15
<i>Sideritis raeseri ssp raeseri</i>	2,67\pm0,57
<i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	4,33\pm0,57

a) 2.5mg/disk b) 10 μ l/disc c) diameter discs Whatman 6mm

d) Η διάμετρος του δισκίου δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

3.2 Εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των φυτικών εκχυλίσμάτων μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well diffusion method)

Όσα από τα εκχυλίσματα ανέστειλαν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* στη μέθοδο της διάχυσης σε άγαρ με δισκία εξετάστηκαν σε μεγαλύτερη ποσότητα (10 mg) με μια δεύτερη μέθοδο, τη διάχυση σε άγαρ με πηγαδάκια. Ο λόγος ήταν ότι η ποσότητα των 10 mg δεν μπορούσε να εξεταστεί με τη μέθοδο της διάχυσης σε άγαρ με δισκία γιατί σε αυτή την ποσότητα το εκχύλισμα δεν διαχεόταν στο δισκίο. Έτσι εξετάστηκαν με την μέθοδο διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια τα 5 εκχυλίσματα που ανέστειλαν την ανάπτυξη του *Staphylococcus aureus* στη μέθοδο της διάχυσης σε άγαρ με δισκία.

3.2.1. Εκχυλίσματα φασκόμηλου

Συνολικά μελετήθηκαν 4 εκχυλίσματα φασκόμηλου σε ποσότητα 10 mg/well,. τρία εκχυλίσματα από αυτά παρουσίασαν αναστολή ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus*. Το πιο ισχυρό ήταν το υδατικό εκχύλισμα, που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia officinalis* με ΔΑΑ **12,67mm**, ακολουθούσε το υδατικό εκχύλισμα από τη *Salvia pomifera ssp.calycina* με ΔΑΑ **12,33mm** και το υδατικό εκχύλισμα από τη *Salvia pomifera ssp.pomifera* με ΔΑΑ **11mm**. (Πίνακας 9).

Πίνακας 9. Επίδραση των εκχυλισμάτων φασκόμηλου στην αναστολή της ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια

<i>Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well diffusion method)</i>	
Εκχύλισμα 10mg	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)
<i>Salvia officinalis</i>	12,67\pm1,52
<i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	11\pm1
<i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	12,33\pm0,58

a) 10mg/ wells b) 50 μ l/disc c) wells 6mm diameter
d) Η διάμετρος βυθίσματος δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

3.2.2 Εκχυλίσματα μέντας

Εξετάστηκε το υδατικό εκχύλισμα που προέκυψε από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Mentha pulegium* το οποίο έδειξε μέσο όρο διαμέτρου αναστολής της ανάπτυξης **10,67mm** (Πίνακας 10).

Πίνακας 10. Επίδραση των εκχυλισμάτων μέντας στην αναστολή της ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια

Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well diffusion method)	
Εκχύλισμα 10mg	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)
<i>Metnha pulegium</i>	10,67\pm0,57

a) 10mg/ wells b) 50 μ l/disc c) wells 6mm diameter
d) Η διάμετρος βυθίσματος δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

3.2.3. Εκχυλίσματα τσαγιού.

Το υδατικό εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Sideritis raeseri* spp. *raeseri* έδειξε μέσο όρο διαμέτρου αναστολής της ανάπτυξης **9,67mm** (Πίνακας 11).

Πίνακας 11. Επίδραση των εκχυλισμάτων τσαγιού στην αναστολή της ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια

Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well diffusion method)	
Εκχύλισμα 10mg	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)
<i>Sideritis raeseri</i> spp.raeseri	9,67\pm0,57

a) 10mg/ wells b) 50 μ l/disc c) wells 6mm diameter
d) Η διάμετρος βυθίσματος δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

3.2.4. Συνολικά αποτελέσματα της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well diffusion method)

Από την μελέτη των συνολικά 6 εκχυλισμάτων των αρωματικών κατά βάση φυτών, προέκυψε ότι 5 από αυτά τα εκχυλίσματα, όλα υδατικά, παρουσίασαν αναστολή της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* στη ποσότητα των 10mg.

Το πιο ισχυρό ήταν το υδατικό εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia officinalis* με ΔΑΑ **12,67mm**, ακολουθούσε το εκχύλισμα *Salvia pomifera ssp.calycina* με ΔΑΑ **12,33mm**, το εκχύλισμα *Mentha pulegium* με ΔΑΑ **10,67mm** και το εκχύλισμα *Salvia pomifera ssp.pomifera* με ΔΑΑ **11mm** (Πίνακας 12).

Πίνακας 12. Συνολικός πίνακας Επίδρασης των εκχυλισμάτων στην αναστολή της ανάπτυξης *Staphylococcus aureus* μέσω της Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια

Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (Well diffusion method)	
Εκχύλισμα 10mg	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)
<i>Sideritis raeseri ssp. raeseri</i>	9,67±0,57
<i>Salvia officinalis</i>	12,67±1,52
<i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>	12,33±0,57
<i>Mentha pulegium</i>	10,67±0,57
<i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	11±1

a) 10mg/ wells b) 50 µl/disc c) wells 6mm diameter

d) Η διάμετρος βυθίσματος δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

3.2.5. Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα των δυο ποσοτικών μεθόδων αναστολής της ανάπτυξης του *Staphylococcus Aureus*

Από τις δυο μεθόδους η σειρά αντιμικροβιακής δραστηριότητας είναι η παρακάτω:

➤ Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δισκία

Mentha pulegium > *Salvia officinalis* = *Salvia pomifera ssp.calycina* > *Salvia pomifera ssp.pomifera* > *Sideritis raeseri ssp.raeseri*

➤ Μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια

Salvia officinalis > *Salvia pomifera ssp. calycina* > *Salvia pomifera ssp. pomifera* > *Mentha pulegium* > *Sideritis raeseri ssp. raeseri*

Η σειρά της αντιμικροβιακής δραστηριότητας που παρουσίασαν τα εκχυλίσματα παρουσιάζει μικρές αποκλίσεις μεταξύ των δύο μεθόδων που οφείλονται στη διαφορετική ποσότητα εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε στις δύο μεθόδους, στα προβλήματα διάλυσης των εκχυλισμάτων και της διάχυσης τους στη μέθοδο με το δισκίο (Πίνακας 13).

Πίνακας 13. Συνολικά συγκριτικά αποτελέσματα των δυο ποσοτικών μεθόδων αναστολής της ανάπτυξης του <i>Staphylococcus aureus</i>		
Εκχύλισμα	Διάμετρος ζώνης αναστολής (mm)	
	Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια* (10mg εκχυλίσματος)	Μεθόδου διάχυσης σε άγαρ με δίσκία** (2,5mg εκχυλίσματος)
<i>Sideritis raeseri spp. raeseri</i>	9,67±0,57	2,67±0,57
<i>Salvia officinalis</i>	12,67±1,52	4,33±0,57
<i>Salvia pomifera ssp. calycina</i>	12,33±0,58	4,33±0,57
<i>Mentha pulegium</i>	10,67±1,15	4,67±1,15
<i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>	11±1	3,67±0,57

*a) 10mg/ wells b) 50 µl/disc c) wells 6 mm diameter d) Η διάμετρος βυθίσματος δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

**a) 2.5mg/disk b) 10 µl/disc c) diameter discs Whatman 6mm d) Η διάμετρος του δισκίου δεν συμπεριλαμβάνεται στις τιμές

3.3. Προσδιορισμός της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης (minimum inhibitory concentration) με την χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates).

Με τη μέθοδο της μικροτιτλοποίησης προσδιορίσαμε την ελάχιστη συγκέντρωση των εκχυλισμάτων που απαιτείται για την αναστολή του *Staphylococcus aureus*. Τα εκχυλίσματα εξετάστηκαν στις συγκεντρώσεις των 8mg/ml, 6mg/ml και 4mg/ml, 3mg/ml, 2,5mg/ml, και 2mg/ml αντίστοιχα. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε στον πίνακα 14 η ανασταλτική ικανότητα των εκχυλισμάτων διαφέρει με πιο ισχυρό το υδατικό εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia officinalis* που έδωσε ελάχιστη τιμή ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) 2,5mg/ml, ακολουθεί το υδατικό εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Sideritis raeseri ssp.raeseri* με MIC 3mg/ml, και ακολουθούν τα υπόλοιπα τρία υδατικά εκχυλίσματα των φυτών *Salvia Pomifera ssp.calycina*, *Mentha pulegium*, και *Salvia pomifera ssp.pomifera* με τιμή MIC 4mg/ml (Πίνακας 14).

Πίνακας 14. Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση MIC (Minimal Inhibitory Concentration) έναντι του *Staphylococcus aureus*

Εκχύλισμα	Συγκεντρώσεις (mg/ml)					
	8	6	4	3	2,5	2
<i>Salvia officinalis</i>					Minimal Inhibitory Concentration	
<i>Sideritis raeseri ssp.raeseri</i>				Minimal Inhibitory Concentration		
<i>Salvia pomifera ssp.calycina</i>			Minimal Inhibitory Concentration			
<i>Mentha pulegium</i>			Minimal Inhibitory Concentration			
<i>Salvia pomifera ssp.pomifera</i>			Minimal Inhibitory Concentration			
	Ανάπτυξη					
	Αναστολή					
Minimal Inhibitory Concentration	Ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση					

4. Συζήτηση

Τις τελευταίες δεκαετίες αντιμικροβιακά φυτικά προϊόντα έχουν αποκτήσει ένα ιδιαίτερο ενδιαφέρον για την επιστημονική κοινότητα εξαιτίας της αντίστασης που έχουν αναπτύξει στα αντιβιοτικά διάφοροι μικροοργανισμοί (Essawi και Srouf 2000), και των παρενεργειών που μερικές φορές σχετίζονται με αυτά, όπως υπερευαισθησία, ανοσοκαταστολή και αλλεργικές αντιδράσεις (Jang-Gi Choi και συν., 2009).

Πολλές φυσικές ενώσεις που βρίσκονται στα αρωματικά φυτά, στα φαρμακευτικά φυτά, βότανα, και εκχυλίσματα φρούτων έχει αποδειχθεί ότι διαθέτουν αντιμικροβιακές ιδιότητες (Cowan, M και συν., 1999, Kouassi, Y και συν., 1998, Larson, A και συν., 1996, Vattem, D και συν., 2005). Η αντιμικροβιακή δράση από τις πολυφαινόλες, τα φλαβονοειδή και τις τανίνες είναι καλά τεκμηριωμένη στη διεθνή βιβλιογραφία (Ahmad και συν., 2001, Machado και συν. 2003, Naz και συν. 2007, Shan και συν. 2007). Πάρα πολλές βιβλιογραφικές αναφορές γίνονται ειδικά για τα φυτά της οικογένειας Lamiaceae (Mimica-Dukic και συν., 2003, 2004, 2006, Barrata, M 1998).

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και εκτίμηση της αντιμικροβιακής και κατ' επέκταση της χημειοπροστατευτικής δράσης εκχυλισμάτων ενδημικών ελληνικών ποικιλιών φασκόμηλου, μέντας και τσαγιού (του βουνού), έναντι gram θετικών (*Staphylococcus aureus*) και gram αρνητικών (*Pseudomonas aeruginosa* 1737) βακτηριών.

Για την εκτίμηση της αντιμικροβιακής ικανότητας των εκχυλισμάτων, χρησιμοποιήθηκαν τρεις in vitro μέθοδοι, δυο ποιοτικές, «α) η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με δισκία (disk diffusion method), και β) η μέθοδος διάχυσης σε άγαρ με πηγαδάκια (wells diffusion method)» και μια ποσοτική, για τον προσδιορισμό της ελάχιστης ανασταλτικής συγκέντρωσης, η «χρήση πλακών μικροτιτλοποίησης (microtiter plates)». Και οι τρεις μέθοδοι στηρίζονται στην ικανότητα των ουσιών να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηριών. Τα εκχυλίσματα, που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονται από αρωματικά φυτά, *Salvia spp.*, *Mentha spp.*, *Sideritis spp.* και ήταν τριών τύπων, υδατικά, μεθανολικά και διχλωρομεθανολικά.

Σε σύνολο 23 εκχυλισμάτων που μελετηθήκαν, 5 από αυτά παρουσίασαν αντιμικροβιακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus*, με πιο ισχυρό το υδατικό

εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia officinalis* που έδωσε ελάχιστη τιμή ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) 2,5 mg/ml.

Ανασταλτική δράση έναντι *Pseudomonas aeruginosa* 1737 δεν παρουσίασε κανένα από τα προς εξέταση εκχυλίσματα.

Αξιοσημείωτο είναι ότι από τα 23 εκχυλίσματα, ανασταλτική δράση έδειξαν μόνο τα υδατικά. Πιθανώς τα δραστικά συστατικά, ήταν πολικά μόρια που μπορούσαν να διαλυθούν κυρίως στο νερό.

Από τα 5 εκχυλίσματα μέντας προς εξέταση ένα παρουσίασε ανασταλτική ικανότητα. Το υδατικό εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Mentha pulegium* με τιμή MIC 4mg/ml έναντι του *Staphylococcus aureus* και καμιά ανασταλτική δράση έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*. Ανάλογη έρευνα των Nurdan Sarac και συν., (2009) σε διάφορα αιθέρια έλαια διαφόρων αρωματικών φυτών συμπεριλαμβανομένης και του *Mentha pulegium*, έδειξε ότι τα αιθέρια έλαια, ήταν πολύ αποτελεσματικά ενάντια στα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, εκτός από του *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 και *Pseudomonas fluorescens* MU 87.

Επίσης ανάλυση του αιθέριου ελαίου του *Mentha pulegium* αποκάλυψε την παρουσία πιπεριτόνης, πιπεριτινόνης, α-τερπινεόλης, και πουλεγόνης, ως τα κυριότερα συστατικά. Τα αποτελέσματα έδειξαν σημαντική δράση κατά των μικροοργανισμών έναντι κυρίως Gram-θετικών βακτηρίων με διάμετρο ζωνών αναστολής και ελάχιστη ανασταλτική τιμή συγκέντρωσης της τάξης του 8-21mm και 0,25-4 μl/ml, αντίστοιχα, ενώ τα λιγότερο ευπαθή ήταν τα Gram-αρνητικά βακτήρια (Mohaddese Mahboubi και συν., 2008).

Από τα 10 εκχυλίσματα φασκόμηλου προς εξέταση, τρία παρουσίασαν ανασταλτική ικανότητα. Το υδατικό εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Salvia officinalis* που έδωσε ελάχιστη τιμή ανασταλτικής συγκέντρωσης (MIC) 2,5 mg/ml και ακολουθούν τα υπόλοιπα τρία υδατικά εκχυλίσματα των φυτών *Salvia Pomifera ssp.calycina*, και *Salvia pomifera ssp.pomifera* με τιμή MIC 4mg/ml έναντι του *Staphylococcus aureus* αντίστοιχα και καμιά ανασταλτική δράση έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*. Το εύρημα αυτό συμφωνεί με μελέτη των Kumiko H. και συν., που έδειξε την αντιμικροβιακή δράση του εκχυλίσματος *Salvia officinalis* έναντι του *Staphylococcus aureus*. Σύμφωνα με την συγκεκριμένη μελέτη έγινε απομόνωση δυο συστατικών του *Salvia officinalis*, του ολεανολικού και ουρσολικού οξέος, και προσδιορίστηκε η ελάχιστη ανασταλτική συγκέντρωση 16 και 8μg/ml, αντίστοιχα.

Παρατηρούμε μια μεγάλη διαφορά ανάμεσα στα αποτελέσματα της εργασίας μας, και στις συγκεντρώσεις της μελέτης από τους Kumiko H. και συν., διότι χρησιμοποίησαν δυο ξεχωριστά απομονωμένα συστατικά.

Και σε αυτή τη μελέτη κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα συστατικά δεν έχουν ενεργή ανασταλτική δράση έναντι Gram αρνητικών βακτηριών *E.coli* και *Pseudomonas aeruginosa*. Μια πιθανή εξήγηση της μη ανασταλτικής δράσης έναντι των Gram αρνητικών βακτηρίων ίσως να οφείλεται στη παρουσία της εξωτερικής μεμβράνης (Kumiko H και συν.,2007), της μειωμένης διαπερατότητας (μειωμένη έκφραση ή απώλεια πορίνης OprD) ή της υπερέκφρασης των αντλιών εκροής.

Επιπλέον σε μελέτη των Amjad Khalil και συν., (2005) σε εκχύλισμα *Salvia officinalis*, με την μέθοδο διάχυσης σε πηγαδάκια, σε ποσότητα 10mg/well, παρατηρήθηκε αναστολή της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* (ΔΑΑ 16.2mm), ενώ δεν υπήρξε αναστολή της ανάπτυξης της *Pseudomonas aeruginosa*.

Οι Essawi και Srouf (2000) χρησιμοποιώντας την μέθοδο διάχυσης με πηγαδάκια, παρατήρησαν αναστολή της ανάπτυξης του *Staphylococcus aureus* αλλά και της *Pseudomonas aeruginosa*. Αυτό ίσως να οφείλεται στην υψηλή συγκέντρωση εκχυλίσματος που χρησιμοποιήθηκε (150mg/well) ή στη διαφορετική ευαισθησία των 2 στελεχών της *Pseudomonas aeruginosa* που χρησιμοποίησαν. Η αντιβακτηριακή δράση των διαφόρων ειδών φασκόμηλου οφείλεται στα διάφορα συστατικά του, που μπορούν να έχουν συνεργιστική, ή ακόμη, και ανταγωνιστική δράση.

Έχουν γίνει διαφορές μελέτες για την ανάλυση της σύστασης των διαφορών ειδών του φασκόμηλου, ενδεικτικά αναφέρουμε, ανάλυση νωπών φύλλων και ανθέων του *Salvia pomifera*, της ευρύτερης περιοχής της Πελοποννήσου, έδειξε ότι τα κύρια συστατικά των φύλλων είναι α-θυγιόνη, β- θυγιόνη, και 1,8-κινεόλη ,και των ανθέων β- θυγιόνη, β-μπιζαμπολένιο και β-καρυοφυλλένιο (Bellomaria και συν.. 1992)

Για τη *Salvia officinalis* βρέθηκαν καφεϊκό οξύ , ροσμαρινικό οξύ, cis-p-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύλ-)-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο, trans-p-κουμαρικό οξύ 4-O-(2'-O-β-D-απιοφουρανοσύλ-)-β-D-γλυκοκυρανοσίδιο , σαλβιανολικό οξύ I, σαλβιανολικό οξύ K, σαζεκουμαρίνη, φερουλικό οξύ (Κουλάδη Μ, 2005).

Επίσης πιθανή αντιβακτηριακή δράση έναντι του *Staphylococcus aureus* έδειξε να έχει το κλάσμα των διτερπενικών οξέων, από εκχύλισμα του *Salvia apiana* στη συγκέντρωση των 200 μg/ml. (Τζάκου Ο , 2005).

Από τα 5 εκχυλίσματα τσαγιού προς εξέταση ένα παρουσίασε ανασταλτική ικανότητα. Το υδατικό εκχύλισμα από το υπέργειο τμήμα του φυτού *Sideritis raeseri ssp.raeseri* με MIC 3mg/ml έναντι του *Staphylococcus aureus* και καμιά ανασταλτική δράση έναντι της *Pseudomonas aeruginosa*. Σύμφωνα με την διεθνή βιβλιογραφία φυτά του γένους *Sideritis* έχουν αντιμικροβιακή δράση έναντι Gram-θετικών. Η δράση αυτή αποδίδεται σε ορισμένα διτερπένια με παρουσία συστήματος 1,3-διόλης και μιας ακετοξυ-ομάδας. (Diaz et al., 1987, Rodriguez et al., 1994). Σε άλλη μελέτη, από το μεθανολικό εκχύλισμα του *Sideritis raeseri subsp.raeseri*, απομονώθηκαν εννέα διαφορετικές δομές φλαβονών του τύπου 5,8-dihydroxy-flavone- 7-o-allosylglucosides, (Gabrieli και συν. 2005). Επίσης μελέτη των Toda M και συν., (1991) σε εκχύλισμα τσαγιού έδειξε ότι η ECGC, (*digallate theaflavin*) ανέστειλε την ανάπτυξη ανθεκτικών στη μεθικιλίνη στελεχών του *Staphylococcus aureus*.

Οι τρεις μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν προσδιορίζουν την συνολική αντιμικροβιακή ικανότητα των εκχυλισμάτων..

Συνολικά 5 εκχυλίσματα της οικογένειας των Χειλανθών παρουσίασαν σημαντική αντιμικροβιακή δράση και θα πρέπει να γίνει περαιτέρω έρευνα για την ανίχνευση και απομόνωση των βιοδραστικών συστατικών, στα οποία οφείλεται αυτή η δράση.

5. Βιβλιογραφία

- ▶ **Aboutabl EA, Nassar MI, Elsakhawy FM, Maklad YA, Osman AF, El-Khrisy EAM.** 2002. *Phytochemical and pharmacological studies on Sideritis taurica* Stephanex Wild. J Ethnopharmacol 82: 177–184
- ▶ **Akco9 Y, Ezer N, Çalis I, Demirdamar R, Tel BC.** 1999. *Polyphenolic compounds of Sideritis lycia and their anti-inflammatory activity.* Pharm Biol 37: 118–122.
- ▶ **Akiyama, H., K. Fujii, O. Yamasaki, T. Oono, and K. Iwatsuki.** 2001. *Antibacterial action of several tannins against Staphylococcus aureus.* J. Antimicrob. Chemother. 48:487–491.
- ▶ **Alcaraz MJ, Jimenez MJ, Valverde S, Sanz J, Rabanal RM, Villar A.** 1989. *Anti-inflammatory compounds from Sideritis javalambrensis n-hexane extract.* J Nat Prod 52: 1088–1091
- ▶ **Amsterdam, D.,** 1996. *Susceptibility testing of antimicrobials in liquid media.* In: Antibiotics in Laboratory Medicine. Loman, V. (Ed.), Williams and Wilkins, Baltimore,MD, pp. 52–111.
- ▶ **Astill, R., Birch, M. R., Dacombe, C., Humphrey, P. G., Martin, P. T.,** *Factors affecting the caffeine and polyphenol contents of black and green tea infusions,* J. Agric. Food Chem. 2001, 49, 5340 –5347.
- ▶ **Bailey TA, Silvanose CD, Naldo JN, Howlett JH** (2000) *Pseudomonas aeruginosa* infections in kori bustards (*Ardeotis kori*). Avian Pathol 29:41-44
- ▶ **Barberan FAT, Nunez JM, Thomas F,** ‘An HPLC study of flavonones from some Spanish *Sideritis* species” Phytochemistry, vol.24, 1285-1288.1985
- ▶ **Barrata, M T., Dorman H.J.D.; Deans, S G.; Biondi, D.M.; Ruberto,G** *Chemical Composition, Antimicrobial and Antioxidative Activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano, and Coriander Essential Oils.* J. Ess. Oil. Rew 1998, 10,618-627.
- ▶ **Baser, K. H. C., Kurkcuoglu, M., & Kirimer, N.** *Essential oils of Salvia species growing in Turkey. International symposium on essential oils.* Frankfurt, 1998, pp. 29.
- ▶ **Baser, K. H. C., Kurkcuoglu, M., & Kirimer, N.** *Essential oils of Salvia species growing in Turkey. International symposium on essential oils.* Frankfurt, 1998, pp. 29.
- ▶ **Bates, J., J. Z. Jordens, and D. T. Griffiths.** 1994. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococcal infection in man. J. Antimicrob. Chemother. 34:507-514.
- ▶ **Bayrak, A., & Akgul, A.** (1987). *Composition of essential oil from Turkish Salvia species.* Phytochemistry, 26, 846–847
- ▶ **Bayrak, A., & Akgul, A.** (1987). *Composition of essential oil from Turkish Salvia species.* Phytochemistry, 26, 846–847
- ▶ **Carrascal MI.** 1978. *Diterpenes from Sideritis. Part 23. Diterpenes. from S. crispata, S. ilicifolia and S. tragoriganum.* Ann Quim 74: 1547-1550.

- ▶ **Cassadra L., Quavea, Lisa R.W. Planob,1, Traci Pantusoa, Bradley C. Bennetta** 2008 *Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus* Journal of Ethnopharmacology 118 418–428
- ▶ **Chou, C. C., Lin, L. L., Chung, K. T.,** *Antimicrobial activity of tea as affected by the degree of fermentation and manufacturing season*, Int. J. Food Microbiol. 1999, 48, 125–130.
- ▶ **Cowan, M. M. 1999.** *Plant products as antimicrobial agents*. Clin. Microbiol. Rev. 12:564–582.
- ▶ **D. Baricevic, S. Sosa, R. Della Loggia, A. Tubaro, B. Simonovska, A. Krasna and A. Zupancic** (2001) *Topical anti-inflammatory activity of Salvia officinalis L. leaves: the relevance of ursolic acid*. Journal of Ethnopharmacology 75:125-132
- ▶ **Davidson, P.M.** (1997) *Chemical Preservatives and Natural antimicrobial compounds*. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers. Eds. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. pp.520-556, ASM Press, New York.
- ▶ **Davis PH.** *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, vol 7. Edinburgh University Press: Edinburgh, 1982, 400–461
- ▶ **Delamare Longaray, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S.,** 2006. *Antibacterial activity of the essential oils of Salvia Officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil*. Food Chemistry 100, 603–608
- ▶ **Diaz R.M., Garcia-Granados A, Moreno E., Parra A, Quevedo-Sarmiento J., Saenz de Buruaga A, and Saenz de Buruaga J.M. 1988:** *Studies on the Relationship of Structure to Antimicrobial Properties of Diterpenoid Compounds from Sideritis* Planta Med 54: 301–304
- ▶ **Donabedian, S. M., L. A. Thal, E. Hershberger, M. B. Perri, J. W. Chow, P. Bartlett, R. Jones, K. Joyce, S. Rossiter, K. Gay, J. Johnson, C. Mackinson, E. Debess, J. Madden, F. Angulo, and M. J. Zervos.** 2003. *Molecular characterization of gentamicin-resistant enterococci in the United States: evidence of spread from animals to humans through food*. J. Clin. Microbiol. 41:1109-1113.
- ▶ **Eloff, J. N.,** 1998. *A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria*. Planta Medica,
- ▶ **Essawi, T.,& Srour, M** (2000). *Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity*. Journal of Ethnopharmacology, 70, 343-349.
- ▶ **Fernandez C, Fraga MB, Hernalldez GM.** 1986b. *Diterpenes from Sideritis fJutans*. Phytochemistry 25: 2825 - 2827.
- ▶ **Formisano, C., Senatore, F., Arnold, N.A., Piozzi, F., Rosselli, S.,** 2007. *GC and GC/MS analysis of the essential oil of Salvia hierosolymitana Boiss. growing wild in Lebanon*. Natural Product Communications 2, 181–184

- ▶ **Friedman, M., Levin, C. E., Choi, S. –H., Kozukue, E., Kozukue, N.,** *HPLC analysis of catechins, theaflavins, and alkaloids in commercial teas and green tea dietary supplements: Comparison of water and 80% ethanol/water extracts*, J. Food Sci. 2006, 71, C328–C337.
- ▶ **Gabrieli CN, Kefalas PG, Kokkalou EL. 2005.** *Antioxidant activity of flavonoids from Sideritis raeseri*. Journal of Ethnopharmacology 96:423-428.
- ▶ **Gali-Muhtasib, H., Hilan, C., Khater, C., 2000.** *Traditional uses of Salvia libanotica (East Mediterranean sage) and the effects of its essential oils*. Journal of Ethnopharmacology 71, 513–520.
- ▶ **Goodyear, K. L.** 2002. *Veterinary surveillance for antimicrobial resistance*. J. Antimicrob. Chemother. 50:612-614.
- ▶ **Grogan JB.** *Pseudomonas aeruginosa carriage in patients*. J Trauma. 1966;6:639-43
- ▶ **Gulcan Ozkan a , , Osman Sagdic, R. Suleyman Gokturk, Orhan Unal, Sevil Albayrak** *LWT - Food Science and Technology* 43 (2010) 186–190
- ▶ **Gulluce M., F. Sahin, M. Sokmen, H. Ozer, D. DafereraA. Sokmen, M. Polissiou A. Adiguzel and H. Ozkan** 2007, *Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oils and methanol extract from Mentha longifolia L. ssp. Longifolia*. Food chemistry volume 103, Issue 4, Pages 1449-1456
- ▶ **Heath, H. B.** (1981). *Source Book of Flavours*. Westport: Avi, pp.890.
- ▶ **Ho, C.T.** (1992) *Phenolic compounds in foods*. In: *Phenolic Compounds in Food and their Effect on Health I. Analysis, Occurrence and Chemistry*. Eds. Ho, CT., Lee, CY. and Huang, M.T. ACS Symposium Series. Washington, DC.
- ▶ **Hohmann, J., Zupko, I., Redei, D., Csanyi, M., Falkay, G., Mathe, I., et al.** (1999). *Protective effects of the aerial parts of Salvia officinalis, Melissa officinalis and Lavandula angustifolia and their constituents against enzyme-dependent and enzyme-independent lipid peroxidation*. Planta Medica, 65, 576–578
- ▶ **Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Glilani AH,** (2010), *Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four Mentha species*. J Sci Food Agric 2010 Aug 30;90(11):1827-36.
- ▶ **Irobi ON, Moo-Young M, Daramola SO.** In J Pharmacognosy. 1996;34(2):87–90.
- ▶ **J. H., and M. J. Ferraro.** 1998. *Antimicrobial susceptibility testing: general principles and contemporary practices*. Clin. Infect. Dis. 26:973– 980.
- ▶ **Jalsenjak, V., Peljnajak, S .. & Kustrak., D.** (I 987). *Microcapsules of sage oil, essential oils content and antimicrobial activity* Pharmazie. 42, 419-420.
- ▶ **Jang-Gi Choi, Ok-Hwa Kang, Young-Seob Lee, Hee-Sung Chae, You-Chang Oh, Obiang-Obounou Brice, Min-San Kim, Dong-Hwan Sohn, Hun-Soo Kim, Hyun Park, Dong-Won Shin, Jung-Rae Rho and Dong-Yeul Kwon** (2009) *In vitro and In vivo Antibacterial Activity of Punica granatum Peel Ethanol Extract Against Salmonella* . eCAM, doi:10.1093/ecam/nep105

- ▶ **Khan MO, Montecalvo MA, Davis I, Wormser GP** (2000) *Ecthyma gangrenosum in patients with acquired immunodeficiency syndrome*. *Cutis* 66:121-123
- ▶ **Kokkini S, Karousou R, Hanlidou E** “*Biologically active plant compounds* ” Elsevier Science Ltd,2004
- ▶ **Kokkini S, Karousou R, Hanlidou E** “*Herbs of the Labiatae*” Elsevier Science Ltd,2004
- ▶ **Kokkini, S.** 1994. *Herbs of the Labiatae*. Pp. 2342-2348 in *Encyclopedia of Food Science, Food Technology and Nutrition* (R. M acrae, R. Robinson, M . Sadler and G Fullerlove, eds.). A cadem ic Press, London.
- ▶ **Koleva II, Linssen JPH, van Beek TA, Evstatieva LN, Kortenska V, Handjieva N.** 2003. *Antioxidant activity screening of extracts from Sideritis species (Labiatae) grown in Bulgaria*. *J Sci Food Agric* 83: 809–819.
- ▶ **Kouassi, Y., and L. A. Shelef.** 1998. *Inhibition of Listeria monocytogenes by cinnamic acid—possible interaction of the acid with cysteinyl residues*. *J. Food Saf.* 18:231–242.
- ▶ **Kumiko HORIUCHI,a,b Sumiko SHIOTA,b Tsutomu HATANO,c Takashi YOSHIDA,c Teruo KURODA,a and Tomofusa TSUCHIYA,** 2007 , *Antimicrobial Activity of Oleanolic Acid from Salvia officinalis and Related Compounds on Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE)* *Biol. Pharm. Bull.* 30(6) 1147—1149 (2007)
- ▶ **Larson, A. E., R. R. Y. Yu, O. A. Lee, S. Price, G. J. Haas, and E. A. Johnson.** 1996. *Antimicrobial activity of hop extracts against Listeria monocytogenes in media and in food*. *Int. J. Food Microbiol.* 33:195–207
- ▶ **Lawrence B.M.** *Chemical Components of Labiatae Oils and their Expoitation*. In: *Advances in Labiatae Science*, 399-436, Eds R. M. Harley and T. Reynolds, Royal Botanical Gardens, Kew: 1992.
- ▶ **Lin, Y. S., Tsai, Y. J., Tsay, J. S., Lin, J. K.,** *Factors affecting the levels of tea polyphenols and caffeine in tea leaves*, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 1864–1873.
- ▶ **Loizzo, M.R., Saab, A.M., Tundis, R., Menichini, F., Bonesi, M., Piccolo, V., Statti, G.A.,de Cindio, B., Houghton, P.J., Menichini, F.,** 2008. *In vitro inhibitory activities of plants used in Lebanon traditional medicine against angiotensin converting enzyme (ACE) and digestive enzymes related to diabetes*. *Journal of Ethnopharmacology* 119, 109–116.
- ▶ **Loizzo, M.R., Tundis, R., Menichini, F., Saab, A.M., Statti, G.A., Menichini, F.,** 2007. *Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families againstin vitro human tumor models*. *Anticancer Research* 27, 3293–3299.
- ▶ **Longaray Delamare, A.P., Moschen-Pistorello, I.T., Artico, L., Atti-Serafini, L., Echeverrigaray, S.,** 2006. *Antibacterial activity of the essential oils of Salvia Officinalis L. and Salvia triloba L. cultivated in South Brazil*. *Food Chemistry* 100, 603–608
- ▶ **Maria Luisa Sotti; Maria Teresa della Beffa,** *Le piante aromatiche. Tutte le specie più diffuse in Italia*, Milano, Editoriale Giorgio Mondadori, 1989.

- ▶ **Masaki, H., Sakaki, S., Atsumi, T., & Sakurai, H.** (1995). *Activeoxygen scavenging activity of plant extracts*. Biological and Pharmacological Bulletin, 18(1), 162–166.
- ▶ **Menghini L.Massarelli P, Bruni G, Meghini A.** “*Preliminary evaluation on anti-inflammatory and analgesic effects of Sideritis syriaca L. herba extracts*” .J Med Food 2005 Summer;8(2):227-31.
- ▶ **Mimica–dukic N, Bozin B.** *Mentha L. species (Lamiaceae) as promising sources of bioactive secondary , metabolites.* ,Curr Pharm Des,2008;14(29):3141-50.
- ▶ **Mimica-Dukic, N.; Simin, N.. Anackov, G.** *Charaterization of the Volatile Composition of Essential Oils of Some Lamiaceae Species and the Antimicrobial and Antioxidant of the Entire Oils.* J. Agric. Food Chem 2006, 54, 18221828.
- ▶ **Mimica-Dukic, N.; Bozín, B.; Sokovic, M Simin, N.** *Antimicrobial and Antioxidant Acrivities of Melissa officinalis L. (Lamiaceae) Essential Oils* J. Agric. Food Chem 2004.52,2485-2489.
- ▶ **Mimica-Dukic, N.; Bozín, B.; Sokovic, M.; Mihailovic, B.; Matavulj, M.** *Antimicrobial and Antioxidant Acrivities of Three Mentha Species Essential Oils.* Planta Med 2003, 69, 413--419.
- ▶ **Miura, K; Kikuzaki, H; Nakayami, N** (2001) *Apianane terpenoids from Salvia officinalis.* Phytochemistry 58:1171-1175
- ▶ **Mohaddese Mahboubi and Ghasem Haghi, 2008,** *Antimicrobial activity and chemical composition of Mentha pulegium L. essential oil,* Journal of Enthoahrmacology Volume119 Issue 2 Pages 325-327
- ▶ **Mohamed Hajji, Ons Masmoudi, Nabil Souissi, Yosra Triki, Sadok Kammoun, Moncef Nasri** *Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from Periploca laevigata root barks* 2010, Food chemistry vol. 121, no3, pp. 724-731
- ▶ **Mokhlasur Rahman, Inger Ku`hn, Motiur Rahman, Barbro Olsson-Liljequist, and Roland Mollby** 2004. *Evaluation of a Scanner-Assisted Colorimetric MIC Method for Susceptibility Testing of Gram-Negative Fermentative Bacteria* APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr., p. 2398–2403
- ▶ **Moleyar V.Narasimham P.,** *Antifungal activity of some essential oil components .* International Journal of Food Microbiology 3 (1986) 331-336
- ▶ **Morris, J khetry, A Seit, E W.** *Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils.* JAm. Oil Chem. Socs.,1 1979, 56, 598-619.
- ▶ **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1993. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.* Approved standard. NCCLS document M2-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- ▶ **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 1997. *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests.* Approved standard M2-A6. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

- ▶ **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2000. *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*. Approved standard M7–A5, vol. 20, no 2. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.
- ▶ **Nurdan Sarac, Aysel Ugur.**(2009) *The In Vitro Antimicrobial Activities of the Essential Oils of Some Lamiaceae Species from Turkey*. Journal of Medicinal Food. August 2009, 12(4): 902-907.
- ▶ **Ozen, H.C., Toker, Z., Ertekin, A.S.,** 2004. *Essential oil composition of two Salvia species from Turkey*. AFS, Advances in Food Sciences 26, 32–34.
- ▶ **Pang LH, de las Heras B, Hoult JRS.** 1996. *Novel diterpenoid labdane from Sideritis javalambrensis inhibits eicosanoid generation from stimulated macrophages but enhances arachidonate release*. Biochem Pharmacol 51: 863–868.
- ▶ **Papanikolaou K, Kokkini S.** 1982. *A taxonomic version of Sideritis L. section Empedoclia (Rafin.) Bentham (Labiatae) in Greece. In Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects*. Martinus Nijoff: The Hague, 101–128.
- ▶ **Papanikolaou K, Kokkini S.** 1984. *A thin-layer chromatographic study of some chemical leaf constituents in Sideritis L, sect Empedoclia (Rafin) Bentham (Labiatae) in Greece, Feddes Reperorium* 95(5-6):359-368,1984
- ▶ **Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Uberegga, E., & Conte, L. S.** (2002). *Antioxidant activity of sage (Salvia officinalis and S. fruticosa) and oregano (Origanum onites and O. intercedens) extracts related to their phenolic compound content*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 1645–1651
- ▶ **Pizzale, L., Bortolomeazzi, R., Vichi, S., Uberegga, E., & Conte, L. S.** (2002). *Antioxidant activity of sage (Salvia officinalis and S. fruticosa) and oregano (Origanum onites and O. intercedens) extracts related to their phenolic compound content*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 82, 1645–1651
- ▶ **Quer FP.** 1962. *Planta Medicinales*. Ed. Labor: Barcelona, Spain
- ▶ **Raal, A., Orav, A., Arak, E.,** 2007. *Composition of the essential oil of Salvia officinalisL. from various European countries*. Natural Product Research, Part A: Structureand Synthesis 21, 406–411.
- ▶ **Rahme LG, Ausubel FM, Cao H,** (2000) *Plants and animals share functionally common bacterial virulence factors*. Proc Natl Acad Sci USA 97:8815-8821
- ▶ **Raman N, Kulandaisamy A, Jeyasubramanian K.** 2001. *Synthesis, spectroscopic characterization, redox, and biological screening studies of some Schiff base transition metal (II) complexes derived from salicylidene-4-aminoantipyrine and 2 amillophenol/2-aminothiophenol*. Synth .React Inor Met-Org Chem 31: 1249-1260.
- ▶ **Ryu, S.Y., Lee, C.O., Choi, S.U.,** 1997. *In vitro cytotoxicity of tanshinones from Salvia miltiorrhiza*. Planta Medica 63, 339–342.

- ▶ **Samaras, G., S.P. Chatzopoulou, H.A. Goliaris, D. Mitsogiannis, and S. Galanopoulou-Sendouca.** 2002. *The effect of the altitude on the yield and quality of the essential oil from greek mountain tea. Presented at 2nd Conference on Medicinal and Aromatic Plants of Southeasten European Countries, Chalkidiki, Greece, 29 Sept.-3 Oct., 2002.*
- ▶ **Schwarz K, Ternes W.** *Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes.* Z Lebensm Unters Forsch. 1992 Aug;195 (2):99-103.
- ▶ **Schwarz K, Ternes W.** *Antioxidative constituents of Rosmarinus officinalis and Salvia officinalis. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes.* Z Lebensm Unters Forsch. 1992 Aug;195(2):99-103.
- ▶ **Sefidkon, F., Hooshidary, F., Jamzad, Z.,** 2007. *Chemical variation in the essential oil of Salvia bracteata Banks & Soland from Iran.* Journal of Essential Oil-Bearing Plants 10, 265–272
- ▶ **Sezik, E., & Yesilada, E.** (1999). *Essential oils.* In N. Krimer, & A. Mat (Eds.), Honour of Prof. Dr. K. H. C. Baser on his 50th birthday (pp. 98). Turkey: Eskisehir.
- ▶ **Shea, K. M.** 2003. *Antibiotic resistance: what is the impact of agricultural uses of antibiotics on children's health.* Pediatrics 112:253-258.
- ▶ **Simon, J.E., A.F. Chadwick and L.E. Craker.** 1984. *Herbs: An Indexed Bibliography. 1971-1980. The Scientific Literature on Selected Herbs, and Aromatic and Medicinal Plants of the Temperate Zone.* Archon Books, 770 pp., Hamden, CT.
- ▶ **Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T., & Arsenakis, M.** (1997). *Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of Salvia fruticosa essential oil.* Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3197-3201.
- ▶ **Strid A, Tan K.** 1991. *Mountain Flora of Greece.* Edinburgh University Press: Edinburgh, Vol. II, 84–91.
- ▶ **Sur, S. V., Tuljupa, F. M., & Sur, L. I.** (1991) .• *Gas chromatographic determination of monoterpenes in essential oil medicinal plants.* Journal of Chromatography, 542,451-458.
- ▶ **Toda, M., Okubo, S., Hara, Y., Shimamura, T.,** *Antibacterial and bactericidal activities of tea extracts and catechins against methicillin resistant Staphylococcus aureus,* Nippon Saikingaku Zasshi 1991, 46, 839–845.
- ▶ **Tutin TG, Heywood VH, Burgess NA et al,** 1972. *Flora Europea.* Cambridge University Press: Cambridge, Vol. 3, 138
- ▶ **U.S.Department of Health & Human Service, FDA** U.S Food and Drug Administration, Bad Bug Book: *Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Staphylococcus aureu.* www.fda.gov
- ▶ **Unsold H, Eisinger I** (2000) *Epiduraler Abszess. Zweimalige Anlage eines Epiduralkatheters zur Dämpfung der Wehenschmerzen.* Anaesthesist 49:960-963

- ▶ **Van den Bogaard, A. E., and E. E. Stobberingh.** 2000. *Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans.* Int. J. Antimicrob. Agents 14:327-335.
- ▶ **Vattem, D. A., Y.-T. Lin, R. Ghaedian, and K. Shetty.** 2005. *Cranberry synergies for dietary management of Helicobacter pylori infections.* Process Biochem. 40:1583–1592.
- ▶ **Villar A, Jimenez A Manez S,** “*Sur la distribution des metathoxyflavones dans legerne Sideritis plantes medicinales et phytotherapie*”
- ▶ **Villar A, Gasco MA, Alcaraz MJ:** Planta Med 1985, 51 :455
- ▶ **W. M. Kirby, J. C. Sherris, and M. Turck.** 1966. *Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method.* Am. J. Clin. Pathol. 45:493–496.
- ▶ **Walker, R. A., A. J. Lawson, E. A. Lindsay, L. R. Ward, P. A. Wright, F. J. Bolton, D. R. Wareing, J. D. Corkish, R. H. Davies, and E. J. Threlfall.** 2000. *Decreased susceptibility to ciprofloxacin in outbreak-associated multiresistant Salmonella typhimurium DT104.* Vet. Rec. 147:395-396.
- ▶ **Wang, H., Helliwell, K., You, X.,** *Isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC,* Food Chem. 2000, 68, 115–121.
- ▶ **Weiduo Si; Gong, J.; Rong Tsao; Kalab, M.; Yang, R.; Yulong Yin (2006)** *Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract.* Journal of Chromatography A 1125 (2) 204–210
- ▶ **Willis JC.** 1966. *A Dictionary of the Flowering Plants and Ferns,* 7th edn. Cambridge University Press: Cambridge, 1038.
- ▶ **Yinrong Lu and L. Yeap Foo** (1999) *Rosmarinic acid derivatives from Salvia officinalis.* Phytochemistry 51:91-94
- ▶ **Yoda, Y., Hu, Z. Q., Zhao, W. H., Shimamura, T.,** *Different susceptibilities of Staphylococcus and Gram-negative rods to epigallocatechin gallate,* J. Infect. Chemother. 2004, 10, 55–58.
- ▶ **Zheng W, Wang S Y** *Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs.* J Agric Food Chem 2001 Nov;49(11):5165-70
- ▶ **ANKO A.E** 2000 «*Μελέτη Σκοπιμότητας και Επιχειρησιακό Σχέδιο για τη σύσταση και λειτουργία επιχείρησης Αρωματικών Φυτών*».
- ▶ **Βαρδαβάκης Μ.,** 1993 *Συστηματική Βοτανική.* Τόμος Ι Εκδόσεις Τετάρτη
- ▶ **Γκόλιαρης, Α** 1999,ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε., Πρακτικά εκπαιδευτικού διημέρου:«*Το Τσάι του βουνού*» Περτούλι Τρικάλων, 19-20 Ιουνίου 1999 ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΤΑΙΡΕΙΑ ΕΘΝΟΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑΣ
- ▶ **Γκόλιαρης, Α.** 1984. *Το τσάι του βουνού και η καλλιέργεια του.* Υπουργείο. Γεωργίας. Τεύχος 16:29-31. Αθήνα.
- ▶ **Γκόλιαρης, Α.** 1987. *Η βελτίωση στο τσάι του βουνού (Sideritis L.)* Επιστημονικό δελτίο τμήματος αρωματικών φυτών ΚΓΕΜΘ σελ. 27-32. Θεσ/νίκη.
- ▶ **Δημητρακόπουλος Γ.** *Ιατρική Βακτηριολογία,* Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδη, Αθήνα 1982.

- ▶ **Ζαννέτου-Παντελή Κ.** 2000. *Η θεραπευτική δυνατότητα των φαρμακευτικών φυτών της Κύπρου*. Λάρνακα 2000.
- ▶ **Κοκκίνη Στέλλα**, *ΦΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ - ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΣ ΔΡΑΣΤΙΚΑ*, 2003
- ▶ **Κουλάδη Μαρία** , 2005 “Χημικά συστατικά ειδών του γένους *Salvia* L. ” “Χημικά συστατικά ειδών του γένους *Salvia* L” Πρακτικά επιστημονικής διημερίδας: «*Το Ελληνικό Φασκόμηλο*» , Ζαγορά Πηλίου, 25 & 26 Ιουνίου 2005 Υπό την αιγίδα του Πανελληνίου φαρμακευτικού συλλόγου
- ▶ **ΛΑΖΑΡΗ Δ**, 2005“*Το Ελληνικό Φασκόμηλο*” Πρακτικά συνεδρίου Ελληνικής Εταιρίας Εθνοφαρμακολογίας Ζαγορά Πηλίου, 25 & 26 Ιουνίου 2005
- ▶ **Σαρκής Γ.** 1994 «*Αρωματικά και Φαρμακευτικά φυτά*», Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
- ▶ **Τζάκου Όλγα** , “*Salvia* Βιολογική Φαρμακευτική δράση ” Πρακτικά επιστημονικής διημερίδας: «*Το Ελληνικό Φασκόμηλο*» Ο, Ζαγορά Πηλίου, 25 & 26 Ιουνίου 2005 Υπό την αιγίδα του Πανελληνίου φαρμακευτικού συλλόγου